

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Pavel Talacko

Katepsin L z klíštěte obecného: analýza proteolytické aktivity a její regulace

Cathepsin L from the hard tick *Ixodes ricinus*: analysis of proteolytic activity and its regulation

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Michaelu Marešovi, CSc. za ochotu a trpělivost při vedení této práce. Dále děkuji Mgr. Martinu Hornovi, CSc., a Mgr. Zuzaně Kovářové za cenné rady a nezištnou pomoc při řešení nejrůznějších problémů. V neposlední řadě děkuji všem ostatním členům laboratoře a vstřícnost a ochotu kdykoliv poradit. Za posouzení práce děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc.

Abstrakt

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je parazit sající krev, jehož význam spočívá v přenosu patogenů způsobujících klíšťovou encefalitidu nebo lymskou boreliosu. Při trávení proteinů z krve hostitele hrají důležitou roli katepsinové proteasy. Tyto proteiny jsou zajímavé jako antigeny pro vývoj protiklíštěcích vakcín. Tato práce se zabývá katepsinem L z klíštěte obecného, konkrétně isoenzymy IrCL1 a IrCL3.

IrCL1 byl exprimován v kvasinkách *Pichia pastoris* a chromatograficky purifikován z expresního media. Byla určena substrátová specifita IrCL1 pomocí štěpení (a) peptidových fluorogenních substrátů, (b) proteinových substrátů analyzovaných hmotnostní spektrometrií. Proteolytická aktivita IrCL1 byla modulována interakcí s glykosaminoglykany, která ovlivňuje aktivitní pH optimum. Dále byl připraven proteolyticky aktivní mutant IrCL1 s redukováným počtem N-vázaných oligosacharidů vhodný pro krystalizační experimenty. IrCL3 byl exprimován v *Escherichia coli*, refoldován a aktivován do funkční formy. Proteolytická aktivita IrCL3 v řadě aspektů připomíná IrCL1 včetně substrátové specifity, kyselého pH optima a modulační interakce s glykosaminoglykany.

Klíčová slova: cysteinové proteasy, katepsin L, klíště *Ixodes ricinus*, substrátová specifita, proteolytická aktivita

Abstract

The hard tick *Ixodes ricinus* is an important blood-feeding parasite that transmits tick-borne diseases, such as tick-borne encephalitis and Lyme disease. Ticks employ a battery of proteolytic enzymes, including cathepsins, to digest their bloodmeal. These proteins are potential targets for the development of anti-tick vaccines. This work is focused on cathepsin L from *I. ricinus* (IrCL), namely its isoenzymes IrCL1 and IrCL3.

IrCL1 was expressed in *Pichia pastoris* and chromatographically purified. Its substrate specificity was determined by the cleavage of (a) peptide fluorogenic substrates and (b) protein substrates analyzed by mass spectrometry. The proteolytic activity of IrCL1 was modulated by its interaction with glycosaminoglycans, which affected the pH optimum value. Furthermore, a proteolytically active mutant of IrCL1 with reduced number of N-glycosylation sites was prepared; this form will be used for crystallization experiments. IrCL3 was expressed in *Escherichia coli*, refolded and activated to its active form. The proteolytic activity of IrCL3 is in many aspects similar to that of IrCL1, including substrate specificity, acidic pH optimum and activity modulation by glycosaminoglycans.

Key words: cysteine proteases, cathepsin L, hard tick *I. ricinus*, substrate specificity, proteolytic activity

(In Czech)

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
APS	peroxodisíran amonný
AMC	7-amido-4-methylkumarin
AMP	adenosinmonofosfát
Boc	terc-butyloxykarbonyl
Bz	benzoyl
cDNA	komplementární DNA
dexS	dextran sulfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
E-64	N-[N-(L-3-transkarboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FPLC	"Fast protein liquid chromatography"
GAG	glykosaminoglykan
hHb	lidský hemoglobin
HPLC	"High performance liquid chromatography"
HSA	lidský sérový albumin
Ch4S	chondroitin-4-sulfát
IC	inhibiční konstanta
IGF	„Insulin like growth factor“
IL	interleukin
IrCL1	katepsin L z klíštěte <i>Ixodes ricinu</i> , isoenzym 1
IrCL3	katepsin L z klíštěte <i>Ixodes ricinu</i> , isoenzym 3
kDa	kilodalton
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
Na-Acetát	sodno-acetátový pufr
NPY	neuropeptid Y
OD	optická densita
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	polyethylenglykol
pI	izoelektrický bod

RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného
SMMTS	S-methylmethanthiosulfonát
SOC	„super optimal broth with catabolite repression”
Suc	sukcinyl
TAE	pufr obsahující Tris, octovou kyselinu a EDTA
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethylendiamin
TFA	trifluorooctová kyselina
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA2	tromboxan A2
YPD	„yeast pepton dextrose“
YNB	„yeast nitrogen base“
Z	benzyloxykarbonyl

Zkratky aminokyselin:

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová
C	Cys	cystein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	kyselina glutamová
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
L	Leu	leucin
K	Lys	lysin
M	Met	methionin
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratk.....	6
1. ÚVOD	12
1.1. KLÍŠŤATA	12
1.1.1. Taxonomické zařazení klíšťat	12
1.1.2. Životní cyklus klíšťat	13
1.1.3. Výskyt klíšťat.....	14
1.1.4. Trávicí systém klíšťat	15
1.1.4.1. Fyziologie trávení klíšťat.....	17
1.1.4.2. Trávicí proteolysa u klíšťat	18
1.1.5. Interakce klíštěte s hostitelem	20
1.1.5.1. Regulace krevní srážlivosti	20
1.1.5.2. Regulace imunitní odpovědi hostitele	23
1.1.5.3. Proteasy ve slinách klíšťat	24
1.1.5.4. Přenos patogenů klíšťaty.....	24
Klíšťová encefalitida.....	25
Lymeská boreliosa	26
Další nemoci přenášené klíšťaty	28
1.2. PROTEOLYTICKÉ ENZYMY	28
1.2.1. Klasifikace proteas	29
1.2.2. Cysteinové proteasy	29
1.2.2.1. Katalytický mechanismus cysteinových proteas	30
1.2.3. Cysteinové katepsiny	31
1.2.3.1. Lokalizace cysteinových katepsinů.....	32
1.2.3.2. Substrátová specifita cysteinových katepsinů	32
1.2.3.3. Struktura cysteinových katepsinů	34
1.2.3.4. Regulace aktivity cysteinových katepsinů	37
Aktivace zymogenu	38
Modulace aktivity katepsinů pomocí glykosaminoglykanů	41
Modulace aktivity katepsinů pomocí nízkomolekulárních inhibitorů.....	44
Modulace aktivity katepsinů pomocí vysokomolekulárních inhibitorů	46
1.2.2.7. Katepsin L.....	47
Fyziologické funkce katepsinu L.....	47
Katepsin L v patofyziologii	49
Katepsin L klíštěte obecného	49

2.	CÍLE PRÁCE	51
3.	MATERIÁL A METODY.....	52
3.1.	Materiál	52
3.1.1.	Biologický materiál	52
3.1.2.	Chemikálie	52
3.1.2.1.	Kultivační media	52
3.1.2.2.	Substráty	52
3.1.2.3.	Inhibitory	52
3.1.2.4.	Komerční soupravy	53
3.1.2.5.	Ostatní chemikálie	53
3.2.	Přístroje a vybavení	54
3.3.	Metody	55
3.3.1.	Rekombinantní exprese v <i>Pichia pastoris</i>	55
3.3.1.1.	Místně specifická mutageneze	55
	Návrh primerů	55
	Amplifikace DNA metodou PCR	56
	Odstranění templátové DNA	57
3.3.1.2.	Transformace kompetentních buněk	57
3.3.1.3.	Preparace plasmidové DNA	57
3.3.1.4.	Transformace kvasinek <i>P. pastoris</i>	58
	Linearizace plasmidové DNA	58
	Příprava kvasinek <i>P. pastoris</i> na elektroporaci	59
	Transformace pomocí elektroporace	59
3.3.1.5.	Expresse katepsinu L1 z klíštěte <i>I. ricinus</i> v <i>P. pastoris</i>	59
	Optimalizace exprese	59
	Preparativní exprese	60
3.3.2.	Chromatografické metody	60
3.3.2.1.	Gelová chromatografie na koloně Sephadex G25	60
3.3.2.2.	Iontoměničová chromatografie na koloně MonoS	61
3.3.2.3.	Gelová chromatografie na koloně Superdex 75	61
3.3.3.	Precipitační metody	62
3.3.3.1.	Acetonová precipitace proteinů	62
3.3.4.	Analytické metoy	62
3.3.4.1.	Stanovení obsahu proteinů ve vzorku	62
3.3.4.2.	Degradace proteinových substrátů pro elektroforetickou analýzu	62
3.3.4.3.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS	63
3.3.4.4.	Značení pomocí aktivní fluorescenční značky	63
3.3.4.5.	Degradace proteinových substrátů pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie	64
3.3.4.6.	Horizontální agarosová elektroforéza	64
3.3.4.7.	Stanovení koncentrace DNA	65
3.3.4.8.	Určení sekvence DNA	65
3.3.5.	Analýza enzymové aktivity	65
3.3.5.1.	Kinetický test s fluorogenním substrátem	65
3.3.5.2.	Stanovení pH optima	66

3.3.5.3. Určení substrátové specifity.....	66
3.3.5.4. Titrace aktivního místa katepsinu L.....	66
3.3.5.5. Měření kinetických konstant.....	67
3.3.6. Refolding katepsinu L3 z klíštěte <i>I. ricinus</i>	67
4. VÝSLEDKY.....	69
4.1. Katepsin L1 z klíštěte obecného	69
4.1.1. Mutageneze glykosylačních sekvencí IrCL1.....	69
4.1.2. Expres IrCL1 v kvasinkách <i>P. pastoris</i>	70
4.1.3. Izolace rekombinantních forem katepsinu L1	71
4.1.3.1. Izolace IrCL1-WT.....	71
Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie	71
Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie	72
Purifikace pomocí gelové chromatografie	73
4.1.3.2. Izolace IrCL1-T212A.....	75
Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie	75
Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie	75
4.1.4. Biochemické vlastnosti katepsinu L1	76
4.1.4.1. Porovnání vlastností IrCL1-WT a IrCL1-T212A.....	76
Určení pH optima enzymové aktivity.....	76
Analýza pomocí SDS PAGE a fluorescenčního značení	77
Určení aktivitních kinetických konstant.....	78
4.1.4.2. Substrátová specifita IrCL1-WT	79
Nízkomolekulární syntetické substráty.....	79
Degradace proteinových substrátů	80
4.1.4.3. Modulační aktivita IrCL1 pomocí glykosaminoglykanů	82
4.2. Katepsin L3 z klíštěte obecného	86
4.2.1. Refolding aktivního enzymu IrCL3 z inkluzních tělísek	86
4.2.2. Biochemické vlastnosti IrCL3.....	87
4.2.2.1. Porovnání vlastností IrCL3 s homology	87
4.2.2.2. Substrátová specifita IrCL3.....	91
Nízkomolekulární syntetické substráty.....	91
Degradace proteinových substrátů	92
4.2.2.3. Modulační aktivita pomocí glykosaminoglykanů	93
5. DISKUSE	95
6. ZÁVĚR	98
7. PŘÍLOHY	100
Štěpná místa IrCL1 v molekulách proteinových substrátů	100
8. POUŽITÁ LITERATURA	105

1. Úvod

1.1. Klíšťata

Parazité sající krev získávají živiny z krve svého hostitele. Klíšťata (obr. 1.1.) patří mezi roztoče s parazitickým způsobem života. Jedná se o obligátní ektoparazity a hostitele tedy potřebují pro svůj vývoj.¹



Obr. 1.1.: Samička klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Převzato z ⁶.

1.1.1. Taxonomické zařazení klíšťat

Nadříše: *Eukarya*

Říše: *Animalia* (živočichové)

Kmen: *Athropoda* (členovci)

Třída: *Chelicerata* (klepítkatci)

Řád: *Acarina* (roztoči)

Podřád: *Ixodida* (klíšťata)

Čeleď: *Ixodidae* (klíšťovití)

Rody: *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Amblyoma*,
Aponoma, *Rhipicephalus*, *Anocentor*, *Hyalomma*,
Boophilus(*Rhipicephalus*), *Margaropus*

Čeleď: *Argasidae* (klíšťákovití)

Rody: *Ornithodoros, Otobius, Argas, Carios*

Čeleď: *Nuttallielloidea*

Rod: *Nuttalliella*

Klíšťata byla poprvé klasifikována Linnaeusem v roce 1746. Současné rozdělení do tří čeledí bylo vytvořeno Evansem v roce 1992.³

Čeleď *Ixodidae* (klíšťovití, angl. hard ticks) je největší čeledí podřádu *Ixodida* (klíšťata). Je tvořena 683 druhy, což představuje 80 % všech druhů klíšťat. Nejvýznamnějším rodem klíšťat čeledi *Ixodidae* je rod *Ixodes*, do kterého je zahrnuto 241 druhů, což činí asi třetinu všech druhů čeledi *Ixodidae*.² Do čeledi *Argasidae* (klíšťákovití, angl. soft ticks) patří 183 druhů klíšťat. Čeleď *Nuttallielloidea* obsahuje pouze jeden druh *Nuttalliella namaqua* vyskytující se v Africe.³

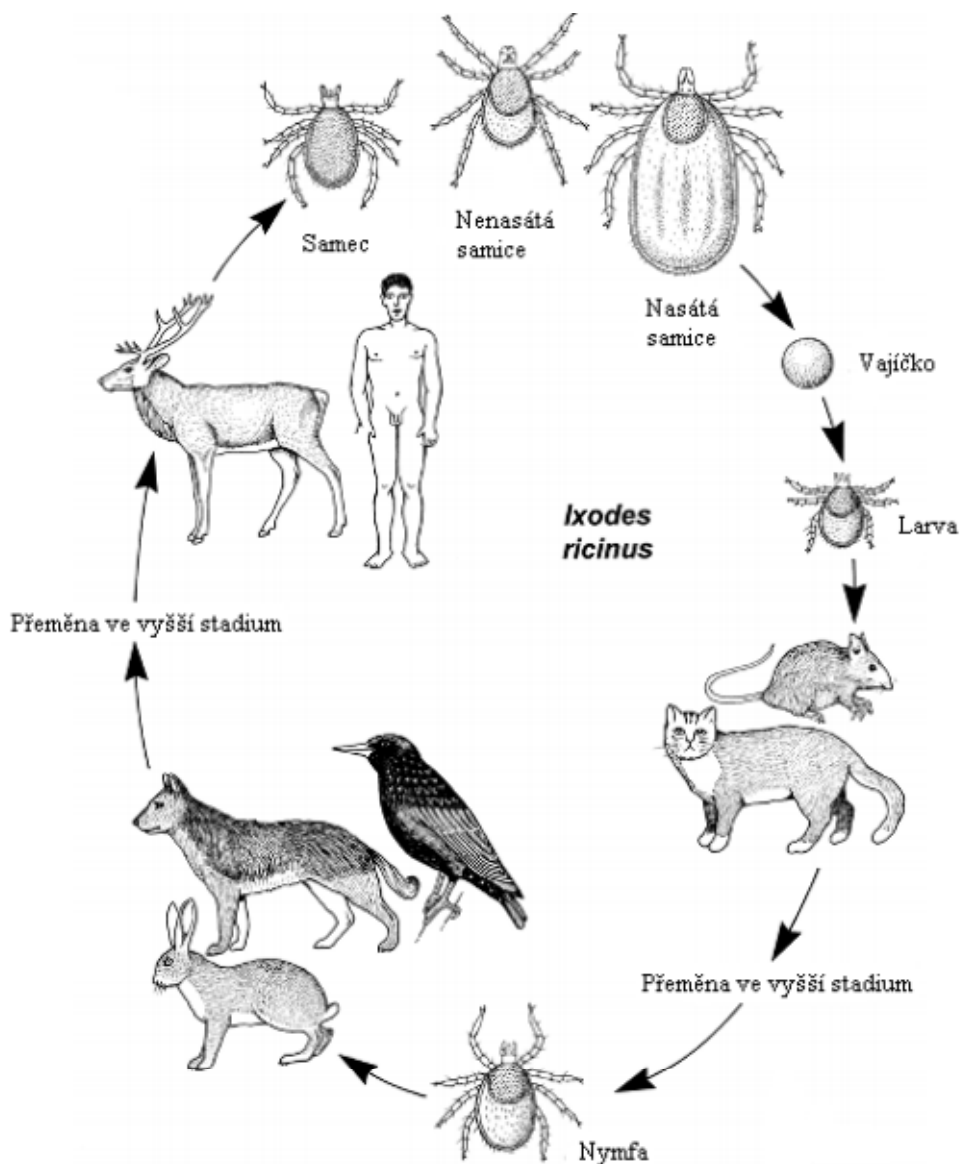
1.1.2. Životní cyklus klíšťat

Klíšťata při svém vývoji procházejí třemi životními stádii. Prvním stadiem je larva, ta se mění v nymfu, ze které vzniká dospělý jedinec (obr. 1.2., str. 14). Larva a nymfa sají krev hostitele vždy jednou, a poté přecházejí do dalšího stádia.

Podle toho, kolik hostitelů klíšťe během svého životního cyklu vystřídá, dělíme klíšťata na jednohostitelská, dvouhostitelská a tříhostitelská.² Jednohostitelská klíšťata se do dospělého stádia postupně přeměňují na jediném hostiteli. Dvouhostitelská klíšťata na prvním hostiteli dospějí v nymfu, která se po nasátí krve hostitele pouští a mimo hostitele se z ní stává dospělec. Ten si následně hledá druhého hostitele, který nutně nemusí být stejného druhu jako hostitel první. Tříhostitelská klíšťata se nikdy nepřeměňují ve vyšší stádium přímo na hostiteli. Larva se po nasátí pouští, přeměňuje se na nymfu. Ta si hledá druhého hostitele, kterého se po nasátí opět pouští a dospívá ve finální životní stádium, které si hledá třetího hostitele.

Dospělci se obvykle páří na hostiteli (výjimkou jsou některé druhy rodu *Ixodes*). Samička se po páření nasaje, pouští se a klade vajíčka. Po nakladení vajíček hyne. Počet nakladených vajíček se pohybuje mezi dvěma tisíci a osmnácti tisíci. Nejméně vajíček kladou jednohostitelská klíšťata, nejvíce tříhostitelská. Ta kladou nejvíce vajíček proto, že jejich životní cyklus je vzhledem k potřebě najít tři různé hostitele nejriskantnější. Z nakladených vajíček se larva líhne během asi 30 dnů.^{2,5}

Při vyhledávání hostitele klíšťata vyčkávají na stoncích rostlin a trávě s nataženým předním párem nohou. V této pozici klíště reaguje na čichové a mechanické vjemy, které jsou pro něj hlavním zdrojem informací a zpracovávají se v Hallerově orgánu. Ten se nachází na terminálním článku prvního páru nohou a obsahuje chemoreceptory a mechanoreceptory. Na menší vzdálenost jsou klíšťata schopna zachytit signál v podobě změny koncentrace CO₂ v jejich okolí, otřesy a změnu vlhkosti.⁵

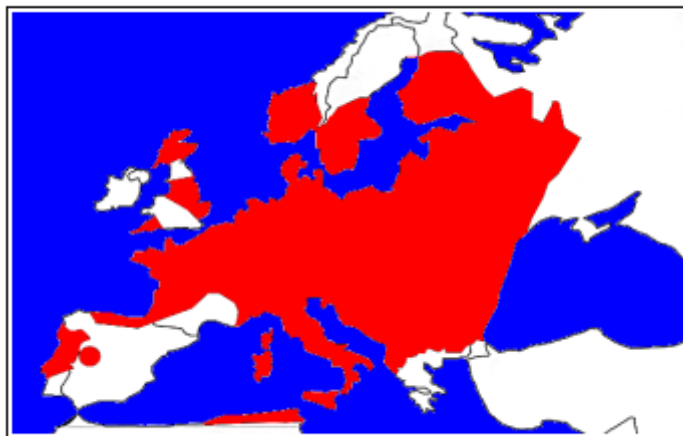


Obr. 1.2.: Životní cyklus klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. Upraveno podle ⁴.

1.1.3. Výskyt klíšťat

Klíšťata čeledi *Ixodidae* se vyskytují převážně v chladných a vlhkých oblastech, převážně křovinatých nebo zalesněných. Hojně se vyskytují i na loukách, polích a

pastvinách s hustou vegetací. Obvykle se nevyskytují v oblastech přesahujících nadmořskou výšku 2000 m. n. m. Klíště obecné se vyskytuje převážně v Evropě (obr. 1.3.), naproti tomu v severní americe je nejhojnější druh *Ixodes scapularis*.^{7, 8}



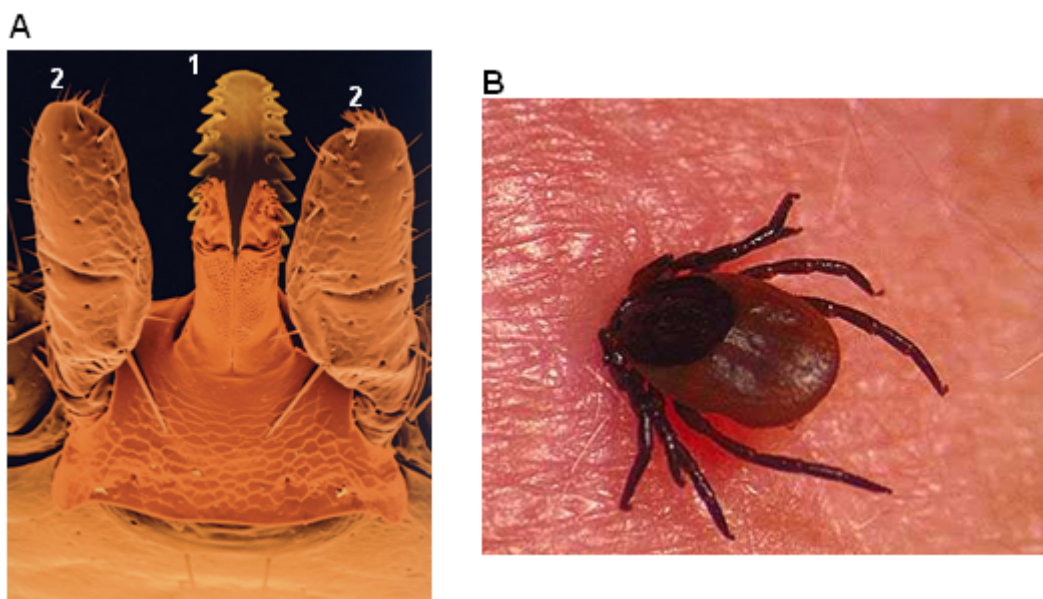
Obr. 1.3.: **Výskyt klíštěte obecného.** Červená barva představuje oblasti, ve kterých převažuje výskyt klíštěte obecného. Upraveno podle ⁹.

1.1.4. Trávicí systém klíšťat

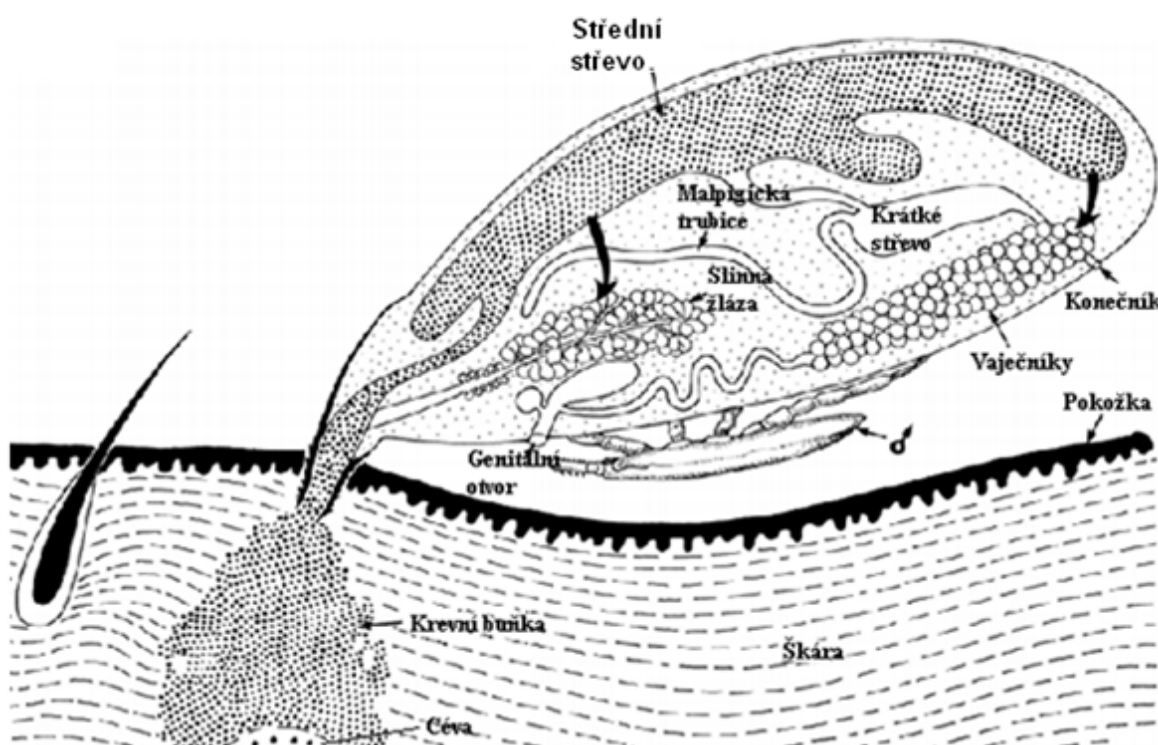
Pro klíšťata je typický příjem velkého množství živin najednou, po kterém může následovat dlouhá doba hladovnění. To je způsobeno vyčkávací strategií klíšťat při vyhledávání hostitele (viz kap. 1.1.2.).¹⁰

Po setkání s hostitelem klíště proniká jeho kůží pomocí ústního ústrojí. To je tvořeno chelicery a hypostomem (obr. 1.4., str. 16). Chelicery u klepátků představují první pár příústních končetin. Hypostom je „sosák“ obsahující na svém povrchu zoubky, které umožní ukotvení klíštěte v místě zachycení. Klíšťata čeledi *Ixodidae* navíc v ráně tvoří tzv. cementovou vrstvu. Ta má proteinovou povahu a slouží k efektivnějšímu upevnění klíštěte. K ukotvení klíštěte pomáhají i palpy.¹

Živiny jsou klíštětem nasávány ústním kanálkem ústícím do hltanu. Ten je u klíšťat hlavním sacím orgánem. Odtud potrava prochází přes jícen do středního střeva (u klíšťat není anatomicky odlišeno střední střevo a žaludek, jedná se o jednu velkou dutinu). Střední střevo vyplňuje převážnou část tělní dutiny klíštěte. Stěna středního střeva je tvořena jednou vrstvou epitelálních buněk. Ty se dělí na tři typy: kmenové, trávicí a sekreční. Střední střevo je pak krátkým střevem propojeno s konečníkem (obr. 1.5., str. 16).⁴



Obr. 1.4.: **Sací ústrojí a ukotvení klíštěte.** A: Sací ústrojí klíštěte obecného. (1 – pilovitý hypostom (nahore) a chelicery, 2 – palpy). Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu. Upraveno podle ¹¹. B: Klíště obecné ukotvené v kůži hostitele. Převzato z ¹².



Obr. 1.5.: Schematické zobrazení vnitřní stavby těla samičky klíštěte obecného. Upraveno podle ⁴.

1.1.4.1. Fyziologie trávení klíšťat

Hlavním zdrojem živin je pro klíšťata krev hostitele.¹ Nasátá krev je trávena v buňkách středního střeva. Celková doba sání je u klíšťat čeledi *Ixodidae* přibližně 7 – 8 dní (klíšťata čeledi *Argasidae* sají jen několik minut až hodin).¹³ Ve chvíli zachycení na hostiteli je epitel středního střeva klíštěte tvořen nediferenciovanými kmenovými buňkami (obr. 1.6., str. 18). V průběhu prvního dne sání střední střevo expanduje a kmenové buňky se diferencují na trávicí buňky prvního typu.¹⁴

Během prvních 4 dní je trávení živin jen nepatrné a dochází zejména k růstu trávicích orgánů a tvorbě pokožky, která během sání prudce expanduje. Samička může objem své tělní dutiny během sání zvětšit až na stonásobek objemu nenasátého jedince.⁴

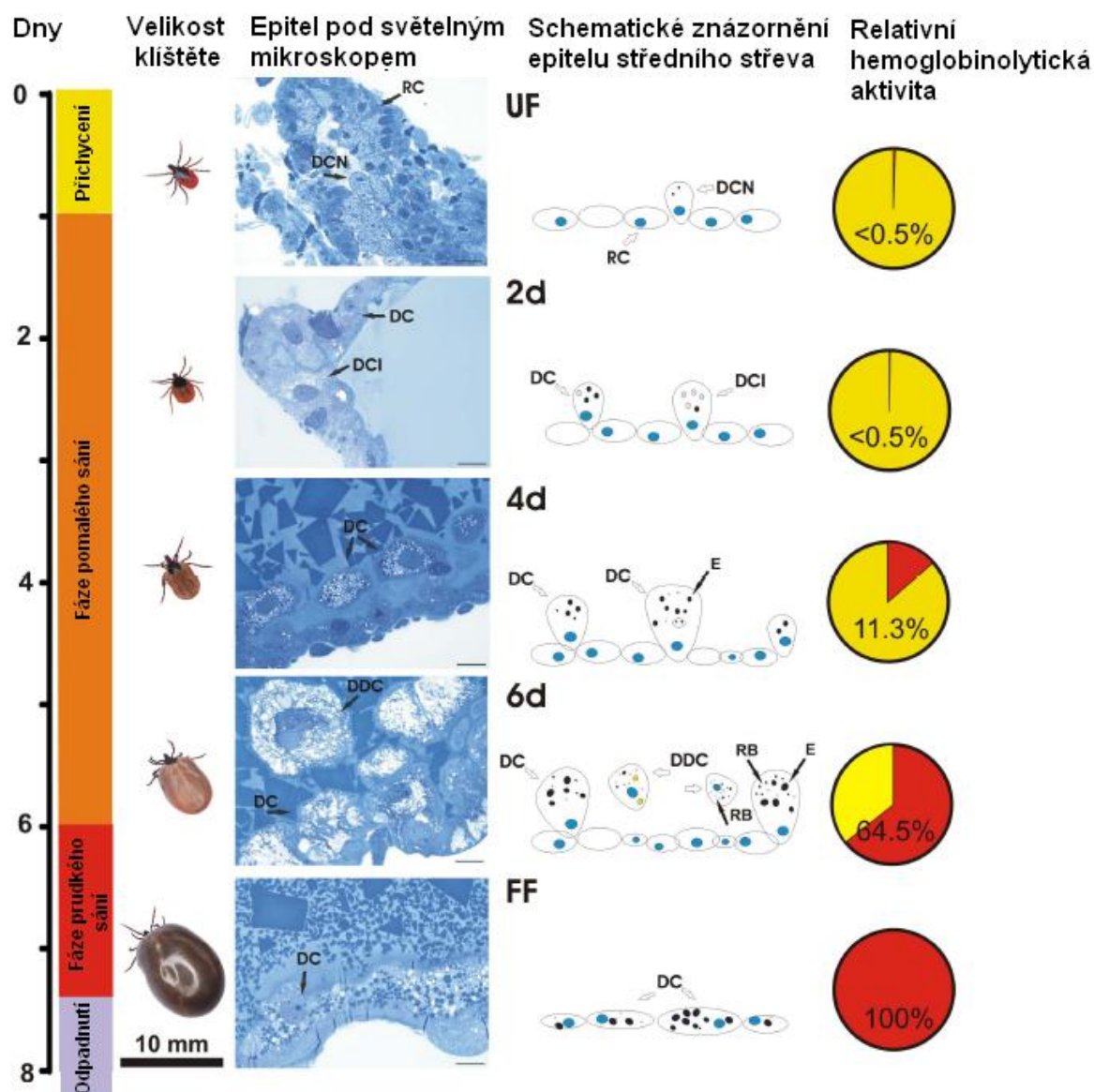
Po fázi pomalého trávení dochází k výrazným morfologickým změnám středního střeva. V této fázi prudkého sání jsou trávicí buňky střeva zvětšeny díky obsahu velkého množství endosomů a inkluzních tělísek obsahujících lipidy. Některé buňky se začínají od střevní stěny odlučovat do lumen střeva a jsou následně defekovány.¹³

Nejvíce krve je nasáto během posledních 24–48 hodin před odpadnutím klíštěte. V této fázi samičky nasávají až dvě třetiny veškeré nasáté krve. Epitel je tvořen plochými trávicími buňkami a nejsou v něm již přítomny kmenové a trávicí buňky prvního typu. Trávení krve je nejrychlejší u čerstvě odpadlých, plně nasátých klíšťat (obr. 1.6., str. 18).¹³

Nasátá krev je trávena intracelulárně epiteliálními buňkami středního střeva. Do těchto buněk je přijatá potrava vstřebávána fagocytosou a pinocytosou.⁴ Bylo však ukázáno, že střevní buňky jsou schopny hemoglobin vstřebávat i pomocí endocytosy zprostředkované receptorem.¹⁵

Hlavní složkou přijímané krve je hemoglobin. Ten obsahuje hem, který je po oddělení od bílkovinné části pro klíště toxický. Střevní buňky obsahují protein schopný vázat hem. Navázaný hem je poté transportován do organel zvaných hemosom, kde se akumuluje a předchází se tím tak poškození buňky.¹⁵

Díky vysokému obsahu vody v krvi klíště nasátou krev zahušťuje asi na třetinu původního objemu.¹ Přibližně 70 % tekutiny je při zahušťování vyloučeno ve slinách zpět do hostitele.¹⁶



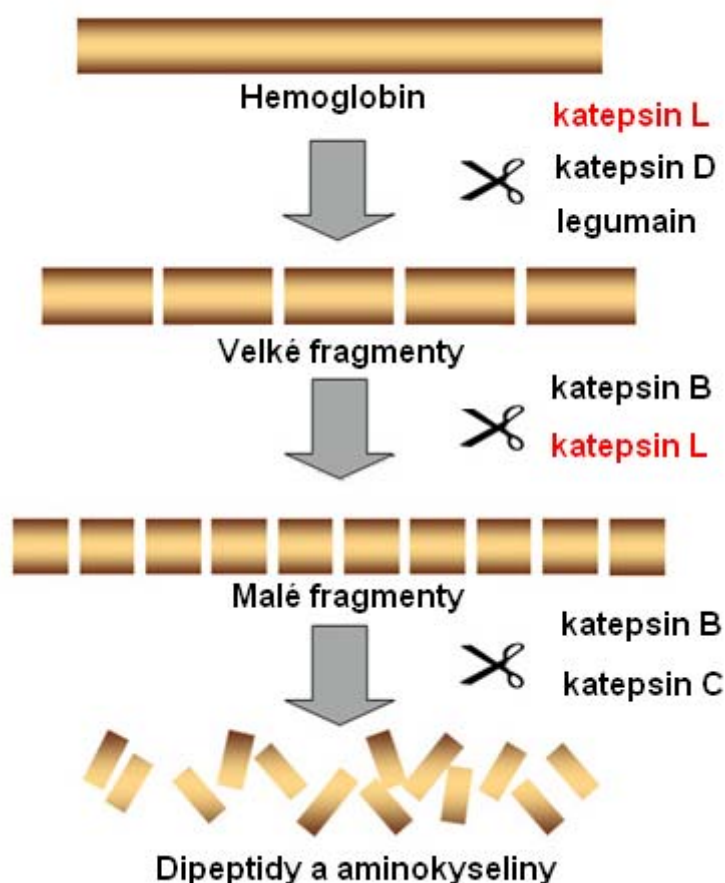
Obr. 1.6.: Přehled fází sání, morfologie středního střeva a hemoglobinolytické aktivity ve středním střevu samičky klíštěte obecného. Sání probíhá 8 dní. Jsou patrné morfologické změny střevního epitelu během jednotlivých fází sání. Většina potravy je nasáta během posledních 24 – 48 hodin před odpadnutím. Vysvětlivky: **UF** – nenásaté klíště; **2d** – **6d** – doba sání ve dnech; **FF** – plně nasaté klíště; **RC** – kmenové buňky; **DCN** – trávící buňky přetrvávající z nymfálního stádia; **DCI** – trávící buňky prvního typu; **DDC** – uvolněné trávící buňky; **RB** – "residual bodies" (tělíska obsahující agregovaný hem, hemosomy); **E** – endosomy. Upraveno podle ¹³.

1.1.4.2. Trávící proteolysa u klíšťat

Trávení živin (zejména hemoglobinu) je u klíšťat zprostředkováno intracelulární lysosomální proteolysou zajišťovanou lysosomálními proteasami. U klíštěte obecného je

založeno na společném působení sady proteas. Klíčovou roli hrají cysteinové proteasy typu katepsin B, C, L a legumain (asparaginylní endopeptidasa) a aspartátová proteasa typu katepsin D (obr. 1.7.).^{17, 18} Podobné složení trávicích proteas bylo nalezeno i u jiných druhů klíšťat.¹⁹⁻²²

Trávicí katepsiny klíšťat vykazují nejvyšší aktivitu v kyselé oblasti pH 3–6. Degradace hemoglobinu byla pozorována při pH 3,5–4,5. Hemoglobin je nejprve naštěpen na velké fragmenty o velikosti 8–11 kDa. Počáteční fragmentace hemoglobinu se účastní převážně katepsin D, katepsin L a legumain. Velké fragmenty jsou v další fázi degradace naštěpeny pomocí katepsinu B a katepsinu L na fragmenty o velikosti 2–7 kDa, které jsou následně štěpeny na dipeptidy pomocí katepsinu B a katepsinu C (díky jejich exopeptidasové aktivitě) a dále na aminokyseliny pomocí serinové karboxypeptidasy a leucin aminopeptidasy.^{17, 18}



Obr. 1.7.: Schématické znázornění degradace hemoglobinu u klíštěte obecného a účast jednotlivých proteas včetně katepsinu L v dané fázi. Upraveno podle ¹⁸.

Výrazně nejvyšší aktivitu v trávicím traktu klíštěte obecného má katepsin B. Aktivita všech zmíněných proteas postupně roste během sání a maxima dosahuje na konci sání (7.–8. den). Růst aktivity je kopírován stupněm exprese jednotlivých proteas, což naznačuje, že aktivita proteas je regulována už na úrovni exprese. Ta dosahuje maxima těsně před odpadnutím klíštěte. Po odpadnutí je trávení zprostředkováno zásobou proteas exprimovaných během sání.¹³

Fragmenty hemoglobinu vzniklé při jeho degradaci navíc mohou klíštěti sloužit jako obranné molekuly, neboť byly ukázány jejich antibakteriální schopnosti.^{22, 23}

1.1.5. Interakce klíštěte s hostitelem

Krev je jediným zdrojem živin pro klíšťata, proto je zajištění jejího úspěšného nasátí klíčovým problémem. Klíště musí efektivně čelit obranným mechanismům svých hostitelů napříč celým jejich druhovým spektrem. Dochází tak k interakci mezi klíštětem a hostitelem. Interakce s hostitelem nezahrnuje pouze inhibici jeho obranných mechanismů, ale i přenos patogenů infikovanými klíšťaty. Všechny tyto interakce budou popsány v následujících kapitolách.

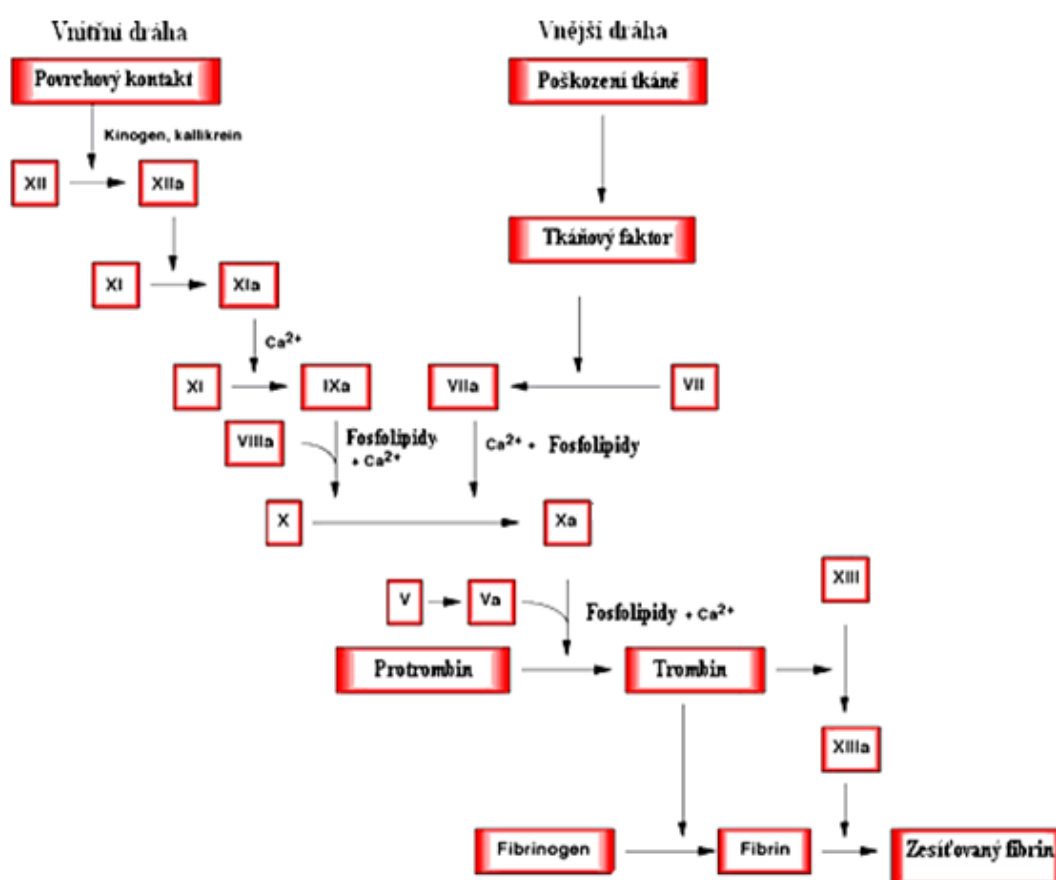
Ve chvíli, kdy klíště pronikne pokožkou hostitele, dochází ve vytvořené ráně k aktivaci obranných mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří aktivace kaskády krevního srážení a agregace krevních destiček a aktivace imunitního systému. Těmto dějům jsou klíšťata schopna čelit pomocí řady biologicky aktivních látek přítomných ve slinách.²⁴

1.1.5.1. Regulace krevní srážlivosti

Existují tři základní mechanismy, kterými hostitel může zabránit ztrátě krve: vazokonstrikce, agregace krevních destiček a srážení krve. Celý tento systém se nazývá hemostáze a všechny jeho části jsou úzce propojeny a velmi jemně regulovány. Výsledkem působení tohoto systému je zacelení rány, čímž se zabrání úniku krve.^{24, 25}

Agregace krevních destiček je indukována řadou faktorů. Mezi ty nejdůležitější patří ADP uvolněné z poškozených buněk (koncentrace ADP je uvnitř buněk asi desetkrát vyšší než v krevní plasmě) a přítomnost kolagenu. Ten není v krvi normálně přítomný, ale nachází se pod endoteliálními buňkami. Jeho výskyt tak signalizuje poškození cévy. Dalšími aktivátory agregace krevních destiček je faktor aktivující destičky (PAF z angl. platelet activating factor; produkovan leukocyty), thrombin (jeden z produktů kaskády

krevního srážení) a tromboxan A2 (TXA2; produkován aktivovanými destičkami). Tyto faktory vedou v krevních destičkách k aktivaci fosfolipasy C a fosfolipasy A2, což vede k indukci exprese integrinu $\alpha_{IIb}\beta_3$. Jedná se o receptor pro fibrinogen, který funguje jako můstek při propojování krevních destiček. Interakce prostřednictvím tohoto receptoru má navíc za důsledek sekreci granulí obsahujících ADP a serotonin a odhalení fosfatidylserinu na povrchu membrány. Serotonin působí jako vazokonstrikční faktor. Aktivace fosfolipasy A2 dále způsobuje uvolnění TXA2, což vede k amplifikaci celého děje. Odhalený fosfatidylserin je díky svému negativnímu náboji jedním z aktivátorů koagulační kaskády.^{27, 28}



Obr. 1.8.: **Kaskáda krevního srážení.** Zobrazeny jsou cesty aktivace koagulace a účastníci se faktory. Upraveno podle ²⁶.

Koagulační kaskáda je sled dějů, během kterých jsou postupně proteolyticky aktivovány jednotlivé faktory krevního srážení (obr. 1.8.). Většina těchto faktorů patří mezi serinové proteasy. Výsledkem je aktivace proteasy prothrombinu za vzniku aktivního thrombinu, který dále štěpí fibrinogen za vzniku fibrinu a navíc efektivně aktivuje krevní

destičky. Vznikající fibrin tvoří síť, která je mechanickou oporou pro tvorbu krevní zátky.²⁶

Klíšťata se hemostázi brání produkcí řady biologicky aktivních látek, které vylučují prostřednictvím slin. Mezi tyto látky patří řada inhibitorů interagujících se serinovými proteasami, které působí jako faktory koagulační kaskády (mezi ně patří i inhibitory tzv. Kunitzova typu, které jsou přehledně shrnuty v ⁴⁹), dále různé látky schopné vázat molekuly způsobující aktivaci krevního srážení, agregaci krevních destiček a vazokonstrikci a v neposlední řadě i enzymy schopné tyto molekuly rozkládat (apyrasa štěpící ATP a ADP na AMP a ortofosfát). Příklady těchto látek jsou uvedeny v tab. 1. Podobné složení slin bylo nalezeno i u jiných členovců sajících krev.⁵⁰

Tab. 1: Přehled bioaktivních molekul identifikovaných ve slinách klíšťat, kterými se brání tvorbě krevní sraženiny

Druh klíštěte	Vazodilatační faktory	Antikoagulační faktory	Faktory inhibující aktivaci krevních destiček
<i>Ambyloma americanum</i>	prostaglandin E ₂ ²⁹ prostaglandin F _{2α} ³⁰	inhibitor faktoru Xa ³¹ antithrombin ³²	antithrombin ³²
<i>Boophilus microplus</i>	prostaglandin E ₂ ³³	antithrombin ³⁴	antithrombin ³⁴
<i>Dermacentor andersoni</i>		inhibitor faktoru V a VII ³⁵	
<i>Dermacentor variabilis</i>			antagonista integrinu αIIb β3 ³⁶
<i>Haemaphysalis longicornis</i>		madanin 1 a 2 ³⁷	madanin 1 a 2 ³⁷
<i>Hyalomma truncatum</i>		inhibitor faktoru Xa ³⁸	
<i>Ixodes scapularis</i>	prostaglandin E ₂ ³⁹	inhibitor tkáňového faktoru ⁴⁰ inhibitor faktoru Xa ⁴¹	apyrasa ⁴²
<i>Ornithodoros moubata</i>		antithrombin ⁴³	Apyrasa ⁴⁴
<i>Ornithodoros savignii</i>		antithrombin ⁴⁵ inhibitor faktoru Xa ⁴⁶	antithrombin ⁴⁵ apyrasa ^{47, 48}
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	prostaglandin E ₂ ⁵⁵		

1.1.5.2. Regulace imunitní odpovědi hostitele

K interakci mezi klíštětem a imunitním systémem hostitele dochází poprvé ve chvíli, kdy klíště pomocí chelicer pronikne skrz pokožku. Malé množství leukocytů přítomné v pokožce a škáře se setkává s ústním ústrojím klíštěte a slinami a uvolňuje řadu chemotaktických faktorů přivádějících do místa proniknutí další imunitní buňky. Výsledkem je aktivace T-buněčné a B-buněčné odpovědi, což vede k produkci protilátek a aktivaci žírných buněk a bazofilů. Průběh těchto dějů je regulován řadou molekul a buněk a klíště se pro zajištění úspěšného sání musí umět účinně bránit.²⁴

Jednou z molekul uvolňovanou především žírnými buňkami je histamin. Jedná se o prozánětlivý bioaktivní amin. Ve slinách klíšťat byly identifikovány proteiny strukturně příbuzné lipokalinům, které jsou schopny histamin účinně vázat a znemožnit tak jeho prozánětlivé působení. Tyto proteiny byly nazvány histakaliny.^{51 - 53} Do skupiny lipokalinů patří i protein nalezený ve slinách klíštěte *Amblyomma americanum*, který je schopný vázat IGF-1 (z angl. insulin-like growth factor). IGF-1 je selektivním chemotaktickým faktorem bazofilů.⁵⁴

Další pro klíště nebezpečnou složkou imunity je komplement. Jedná se o kaskádu proteolytických štěpení komplementových faktorů, která mohou být aktivována dvěma základními cestami. První způsob, označovaný jako klasická cesta, je způsoben vazbou faktoru C1q na imunitní komplex (komplex protilátky navázané antigen). Druhým způsobem je takzvaná alternativní cesta, která se aktivuje při setkání komplementového faktoru C3 se sacharidovým povrchem patogenů. Výsledkem působení komplementu je tvorba lytického komplexu tvořeného faktory C5b, C6, C7, C8 a C9 a chemotaktických a prozánětlivých faktorů C3a a C5a.²⁴

Extrakty slinných žláz (SGE) klíšťat rodu *Ixodes* inhibovaly aktivaci komplementu a u druhu *Ixodes scapularis* byl identifikován antikomplementový protein nazvaný Isac (z angl. *Ixodes scapularis* salivary anticomplement).⁵⁶⁻⁵⁸ Porovnáním sekvence tohoto proteinu s databází transkriptů obsažených ve slinných žlázách klíštěte *I. scapularis* byla identifikována celá rodina těchto antikomplementových molekul.

Komunikace mezi buňkami imunitního systému je z velké části zprostředkována malými parakrinně a autokrinně působícími molekulami zvanými cytokiny. Bylo prokázáno, že SGE klíšťat mohou inhibovat funkce některých cytokinů a byly

identifikovány proteiny schopné cytokiny vázat. Navíc byly nalezeny proteiny schopné vázat imunoglobuliny hostitele.^{60 - 63}

1.1.5.3. Proteasy ve slinách klíšťat

Ve slinách klíšťat byly dosud identifikovány pouze metaloproteasy. U druhu *I. scapularis* byla v cDNA knihovně slinných žláz identifikována přítomnost metaloproteasy patřící do rodiny reprotolysinu. Identifikovaný enzym je sekvenčně podobný metaloproteasám stejné rodiny obsažených v hadím jedu. Charakteristickým strukturním znakem těchto proteas je přítomnost katalytické domény vázající zinek. Také proteolytická (želatinasová a fibrinolytická) aktivita slin *I. scapularis* byla závislá na přítomnosti Zn^{2+} . Zmíněná aktivita usnadňuje spirochétám *Borrelia burgdorferi* průnik do hostitele. Dále tato metaloproteasa fibrinolysou zabraňuje tvorbě krevní zátky, která by klíštěti znemožnila sání.⁶⁴

U druhu *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* byla v SGE identifikována metaloproteasa s kininasovou aktivitou. Schopnost štěpit bradykinin může hrát roli v regulaci imunitní odpovědi.⁶⁵

I u druhů *Haemaphysalis longicornis* a *I. ricinus* došlo k identifikaci genových rodin metaloproteas. Inhibicí exprese některých těchto genů v buňkách slinných žláz bylo klíšťatům znemožněno dokončit sání a docházelo i k ovlivnění fibrinolysy v místě proniknutí. Z toho se dá usuzovat, že proteasy ve slinách pravděpodobně hrají roli při interakci klíštěte a hostitele.^{66, 67}

1.1.5.4. Přenos patogenů klíšťaty

Kklíšťata jsou vektory přenášející řadu patogenů způsobujících závažná onemocnění. Přenos je usnadněn i dobou sání, která je zejména u klíšťat čeledi *Ixodidae* poměrně dlouhá (obvykle 7 – 8 dní). Pro přenos patogenů jsou významné jednak interakce mezi klíštětem a hostitelem, kdy dochází k omezení funkcí imunitního systému hostitele (viz. kapitola 1.1.5.2.), tak i interakce mezi klíštětem a patogenem. Ty zahrnují přežívání a množení patogenu v buňkách klíštěte a poté přenos tohoto patogenu do hostitele. Při přenosu patogenů na hostitele hrají klíčovou roli sliny klíšťat. Experimentálně bylo prokázáno, že v přítomnosti extraktu ze slinných žláz je infekčnost patogenů výrazně vyšší.⁶⁸

Mezi nejčastější a nejzávažnější onemocnění přenášená klíšťaty patří lymská boreliosa a klíšťová encefalitida.

Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida je onemocnění způsobované virem klíšťové encefalitidy. Vyskytuje se od severní Číny a Japonska přes Dálný východ až po Evropu (obr. 1.9.). Poprvé byl virus popsán Australanem Schneiderem v roce 1931.



Obr. 1.9.: Oblasti výskytu klíšťové encefalitidy (tmavě šedá). Převzato z ⁸¹.

Jedná se o virus patřící do rodu *Flavivirus* z čeledi *Flaviviridae*. Jeho hlavním vektorem jsou klíšťata *I. ricinus*. Je tvořen částicemi s lipidovou obálkou, které mají v průměru 40-60 nm (obr. 1.10., str. 26). Jeho genom tvoří jednovláknová pozitivní RNA o délce asi 11 kb s čepičkou na 5' konci, která molekule zajišťuje stabilitu. Genom kóduje tři strukturní proteiny (kapsidový, membránový a obálkový glykoprotein) a sedm nestrukturních proteinů, mezi které patří proteasy, helikasy a RNA dependentní polymerasy.⁶⁹⁻⁷¹

Inkubační doba viru je přibližně 7–14 dní. V úvodní fázi jsou typickými příznaky únava, bolest hlavy, bolesti kloubů (zejména krční páteře, ramen a spodní části zad). Tyto příznaky jsou doprovázeny vysokou horečkou a zvracením. Poté dochází na několik dní ke

zmírnění příznaků, načež nastává druhá fáze. Ta představuje průnik viru do buněk centrální nervové soustavy a s tím související příznaky, jako je zánět mozkových blan a dalších částí mozku (encefalitida, meningitida), napadena může být i mícha (myelitida, radikulitida).⁶⁹



Obr.1.10.: **Virové částice viru klíšťové encefalitidy.** Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Převzato z ⁷².

Množství případů, kdy došlo k propuknutí klíšťové encefalitidy se od sedmdesátých let minulého století průběžně zvyšuje. Mezi lety 1974 a 2003 došlo v Evropě k 400 % nárůstu morbidity a virus se nyní vyskytuje v 16 zemích Evropy. V letech 1990–2007 bylo v Evropě každý rok nakaženo průměrně 8 755 osob.⁷³ Česká republika patří v Evropě mezi země s nejvyšším výskytem klíšťové encefalitidy s 400–1000 případů každý rok.^{74, 81}

V současné době jsou k dispozici čtyři vakcíny, k jejichž výrobě se využívá virus inaktivovaný formaldehydem.^{69, 81}

Lymská boreliosa

Lymská boreliosa je onemocnění způsobované spirochetami *Borrelia burgdorferi* (obr. 1.11., str. 27). Příznaky tohoto onemocnění byly známy již od počátku 20. století, avšak poprvé bylo popsáno až koncem 70. let během epidemie ve městě Lyme v Connecticutu. Původce tohoto onemocnění byl izolován v roce 1982. Jako vektor pro přenos Lymské boreliosisy slouží klíšťata rodu *Ixodes*, rezervoárem jsou převážně malí savci, kteří jsou často nakaženi, ale neprojevují se u nich příznaky onemocnění.⁷⁵



Obr. 1.11.: Bakterie *B. burgdorferi*, původce Lymské boreliosisy. Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu. Převzato z ⁷⁸.

Povrch borrelií je tvořen lipoproteiny a je vysoce proměnný. Exprese jednotlivých lipoproteinů je závislá na prostředí, ve kterém se bakterie vyskytuje a umožňuje tak přežití v různých organismech. Tato změna povrchového složení je i hlavní strategií úniku před imunitním systémem napadeného organismu.⁷⁶ Účinný přenos bakterií z klíštěte na hostitele začíná nejméně 36–48 hodin po přisátí klíštěte.⁷⁷

Po přisátí infikovaného klíštěte se v daném místě obvykle po 7–14 dnech objeví rudá léze (tzv. erythema migrans, obr. 1.12.). Tyto léze přibývají s postupným rozšiřováním bakterií po těle nakaženého. Příznaky onemocnění jsou horečka, bolest hlavy, bolesti svalů a kloubů a vyčerpání. Mohou se objevit i poškození nervového a cévního systému. V určitých případech se tyto problémy mohou vyvinout do chronických onemocnění.⁷⁵



Obr. 1.12.: Erythema migrans. Typický kožní projev Lymské boreliosisy. Převzato z ⁷⁵.

Další nemoci přenášené klíšťaty

Po Lymské boreliose a klíšťové encefalitidě je jedním z nejčastějších onemocnění způsobeným přenosem z klíšťat **ehrlichiosa**. Jedná se o infekční onemocnění způsobované gramnegativními bakteriemi rodu *Ehrlichia*, které napadají leukocyty. Vektorem jsou, stejně jako u Lymské boreliosisy, převážně klíšťata rodu *Ixodes*. Symptomy tohoto onemocnění jsou horečka, bolesti svalů, kloubů a hlavy, nevolnost, zvracení.⁷⁹

Dalším onemocněním přenášeným klíšťaty je **babesiosa**. Jedná se o intraerytrocytární infekci způsobenou prvoky rodu *Babesia*, jejichž vývoj je závislý jak na klíšťatech, tak na teplokrevných zvířatech. Rod *Babesia* byl poprvé identifikován již roku 1888, avšak první případ tohoto onemocnění u člověka byl zaregistrován až v roce 1957.

Přestože jsou hlavními hostiteli volně žijící zvířata, příležitostně dochází k infekci lidí. Toto onemocnění velice často končí smrtelně. Podstatou onemocnění je asexuální reprodukce prvoků uvnitř erytrocytů, což vede k jejich rozpadu.⁸⁰

1.2. Proteolytické enzymy

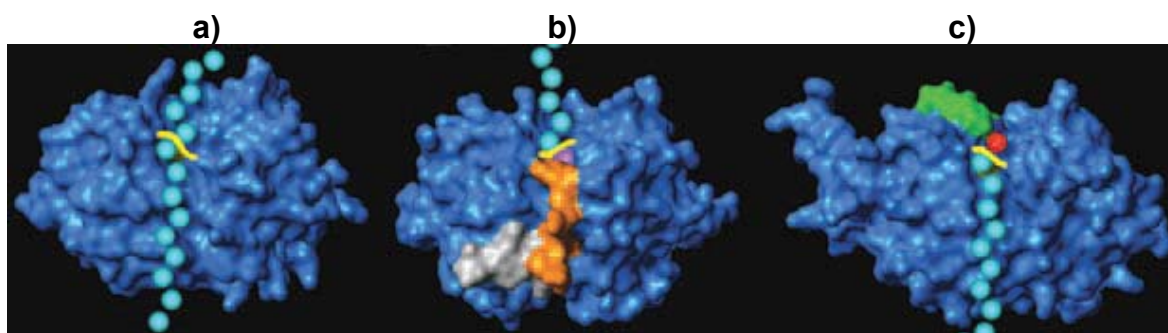
Proteolytické enzymy (též proteasy, proteinasy, peptidasy) jsou enzymy štěpící peptidovou vazbu. Patří do skupiny hydrolytických enzymů, což jsou enzymy štěpící vazby za účasti molekul vody (obr. 1.13.).



Obr. 1.13.: Schéma hydrolýzy peptidové vazby katalyzované proteolytickými enzymy. Upraveno podle ⁸².

Rozlišujeme enzymy štěpící peptidové vazby uvnitř aminokyselinového řetězce, ty se pak nazývají endopeptidasy, a enzymy odštěpující aminokyseliny na konci řetězce, v tom případě se jedná o exopeptidasy. Ty pak podle toho, zda je odštěpovaná aminokyselina přítomna na amino nebo karboxy konci peptidového řetězce, rozlišujeme na aminopeptidasy a karboxypeptidasy (obr. 1.14., str. 29).⁸³

Proteolytické enzymy tvoří až 2 % lidského genomu a jsou zapojeny do velkého množství fyziologicky významných dějů.^{84, 85}



Obr. 1.14.: **Způsoby štěpení substrátu proteolytickými enzymy.** a) Katepsin L – endopeptidasa b) Katepsin H – aminopeptidasa c) Katepsin X – karboxypeptidasa. Štěpený substrát je znázorněn světle modrými kuličkami, štěpená vazba je naznačena žlutě. Fialová kulička představuje odštěpovanou N-koncovou aminokyselinu, červená kulička C-koncovou aminokyselinu. Šedá, oranžová a zelená představují strukturní segmenty enzymu zapříčiňující exopeptidasovou aktivitu. Upraveno podle⁸⁵.

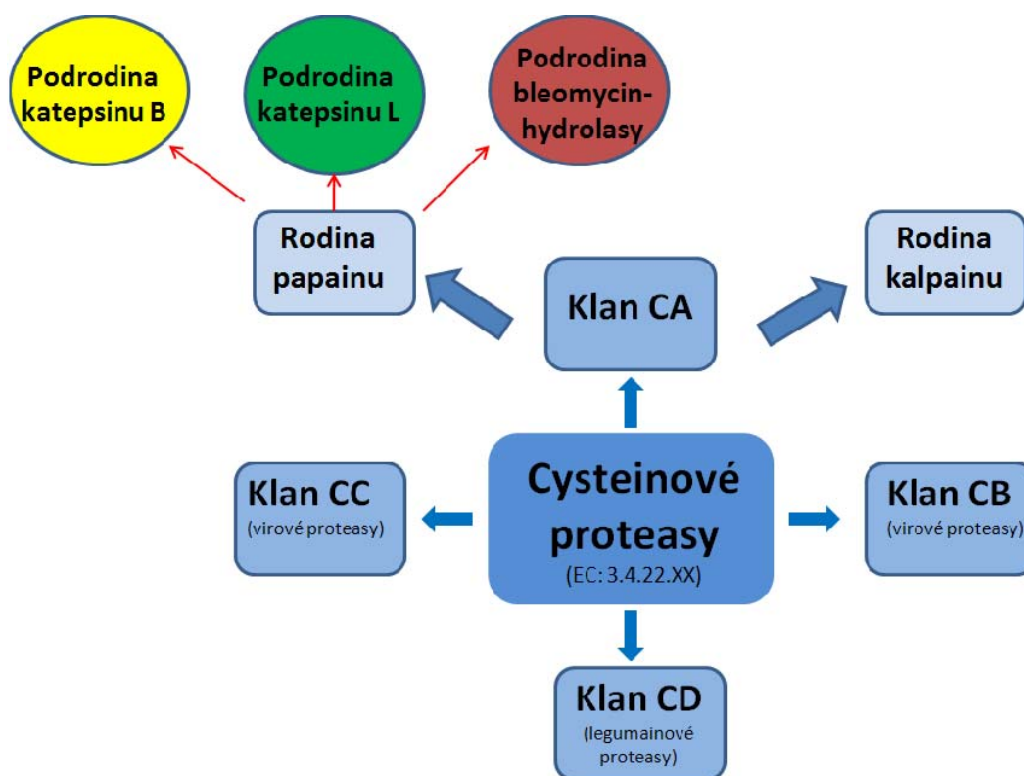
1.2.1. Klasifikace proteas

Základním kritériem pro rozdělení proteolytických enzymů je přítomnost aminokyselinového zbytku v aktivním místě, který hraje klíčovou roli v reakčním mechanismu. Tak rozeznáváme proteasy serinové, threoninové, aspartátové, glutamátové, cysteinové. Zvláštní skupinou proteolytických enzymů jsou metaloproteasy, u kterých je pro katalýzu nezbytný iont kovu.

Dále se proteasy dělí podle evoluční a sekvenční příbuznosti do rodin a podrodin. Skupiny rodin proteas tvoří na základě evoluční příbuznosti klany.^{82, 86}

1.2.2. Cysteinové proteasy

Cysteinové proteasy se v závislosti na jejich struktuře rozdělují do dvou hlavních klanů. Jedná se o klan CA - cysteinové proteasy papainového typu a klan CD - cysteinové proteasy legumainového typu. Klan proteas papainového typu se podle strukturních charakteristik rozděluje do rodin C1 (rodina papainu) a C2 (rodina kalpainu). Papainová rodina se dále dělí na tři podrodiny - proteasy typu katepsinu B, proteasy typu katepsinu L a podrodinu bleomycin hydrolasy (obr. 1.15., str. 30).¹⁰³



Obr. 1.15.: Rozdělení cysteinových proteas. Vytvořeno podle ¹⁰³.

1.2.2.1. Katalytický mechanismus cysteinových proteas

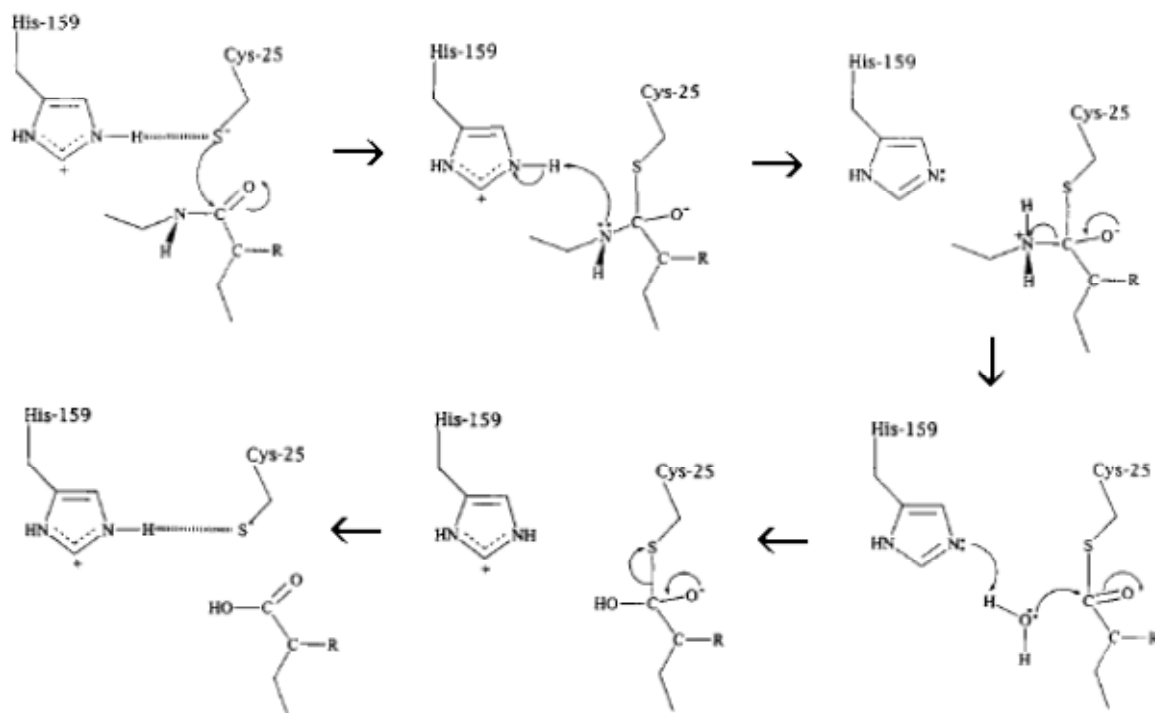
Peptidová vazba je chemicky velice stabilní. Její chemická hydrolýza se obvykle provádí v 6 M HCl při teplotě 100–120 °C po dobu 10–100 hod v bezkyslíkatém prostředí, alternativou je provedení v 2–4 M NaOH při 100 °C po dobu 4–8 hod. Proteolytické enzymy jsou schopny za fyziologických podmínek rozštěpit až stovky peptidových vazeb za sekundu a to bez spotřeby ATP. To ukazuje na vysokou efektivitu těchto enzymů.¹¹⁷

Obecně lze mechanismus proteolytických enzymů rozdělit na tři hlavní kroky:

- 1) Nukleofilní atak karbonylového uhlíku peptidové vazby za vzniku tetraedrického intermediátu.
- 2) Stabilizace oxyaniontu přítomného v tetraedrickém intermediátu.
- 3) Donace protonu odštěpující se aminoskupině.¹¹⁷

U cysteinových proteas hraje roli primárního nukleofilu sulfhydrylová skupina katalytického cysteinu. Její nukleofilita je zvyšována prostorově blízkým zbytkem histidinu za vzniku imidazolium – thiolátového systému. Takto vzniklý nukleofil napadá

karbonylový uhlík peptidové vazby, na kterém je přítomný kladný parciální náboj. Vzniká tak tetraedrický intermediát, kdy je uhlíkový atom štěpené vazby prostřednictvím thioesterové vazby kovalentně propojen s enzymem. Oxyaniont přítomný na tetraedrickém intermediátu je elektrofilně stabilizován v takzvané oxyaniontové jámě. Následuje donace protonu z kladně nabitého katalytického histidinu na nově vznikající koncovou aminoskupinu a uvolnění prvního produktu štěpení. Druhý produkt štěpení je uvolněn nukleofilním atakem vody (jejíž nukleofilita je opět zvýšena katalytickým histidinem) na thioesterově vázaný uhlíkový atom za vzniku koncové karboxylové skupiny. Proton odštěpený z molekuly vody se stává součástí imidazolium – thiolátového systému a aktivní místo je tak připraveno pro štěpení další vazby (obr. 1.16.).^{103 – 105}



Obr. 1.16.: **Mechanismus štěpení peptidové vazby cysteinovými proteasami.** Upraveno podle ¹⁰⁶.

1.2.3. Cysteinové katepsiny

Název katepsin byl zaveden v roce 1929 Willstätterem pro proteasy aktivní v mírně kyselém pH a je odvozen z řeckého slova kathepsin (trávit).

Jedná se o lysosomální proteasy, které pro svoji funkci vyžadují kyselé a mírně redukující prostředí. Jejich primárním úkolem je degradace extracelulárních i

intracelulárních proteinů v lysosomech, avšak paleta jejich dalších funkcí je poměrně pestrá.⁸⁷

Bioinformatickou analýzou lidského genomu bylo nalezeno celkem 11 katepsinů: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X a W. Nejvyšší homologii (75 %) vykazují katepsin L a V.⁸⁸

1.2.3.1. Lokalizace cysteinových katepsinů

Některé katepsiny (např. B, H, L, C, X, F, O) jsou exprimovány ve většině tkání, což naznačuje jejich úlohu na běžné lysosomální proteinové degradaci. Existují ale i tkáňově specifické katepsiny - například katepsin K je specificky exprimován v osteoklastech a epiteliálních buňkách a hraje nezastupitelnou roli v remodelaci kostní tkáně.⁸⁹

Byla prokázána i přítomnost některých katepsinů v jiných buněčných kompartmentech než v lysosomech. Například katepsin L může být lokalizovaný v jádře, kde hraje roli v regulaci buněčného cyklu a při modifikaci histonů (viz. kapitola 1.2.2.7.).^{90, 91}

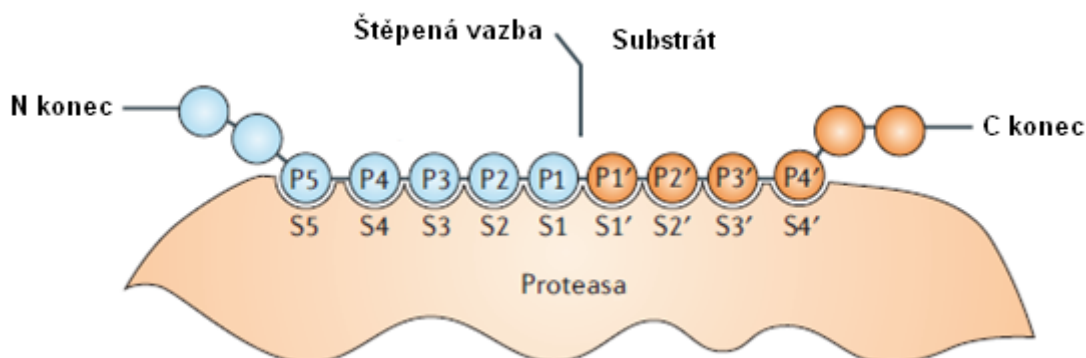
Některé katepsiny byly za určitých podmínek nalezeny i extracelulárně. Například při remodelaci extracelulární matrix.⁸⁷

1.2.3.2. Substrátová specifita cysteinových katepsinů

Navázání substrátu do aktivního místa je zásadní pro rozštěpení dané peptidové vazby. Toto navázání je ovlivňováno jak chemickým prostředím v okolí aktivního místa, tak vlastnostmi substrátu. Na obr. 1.17. (str. 33) jsou znázorněna vazebná podmísta proteasy, do kterých se může vázat peptidový substrát. Podmísta směrem k N-konci štěpeného peptidu jsou označována S1–Sn, naproti tomu podmísta směrem k C-konci peptidu jsou označována S1'–Sn'. Analogicky jsou označovány jednotlivé pozice na vázícím se peptidu: P1–Pn, respektive P1'–Pn'. Mezi vlastnosti důležité při vazbě substrátu řadíme velikost substrátu a aktivního místa a celkově přístupnost štěpené peptidové vazby, dále polaritu, rozložení nábojů a hydrofobicitu jak vazebných míst, tak substrátu.¹⁰³

Vazebná dutina katepsinů je tvořena čtyřmi smyčkami obklopujícími aktivní místo. Z trojrozměrných struktur katepsinů vyplývá, že pro vazbu substrátu jsou nejdůležitější podmísta S2, S1 a S1' a interakcí se účastní jak atomy hlavního řetězce a postranních

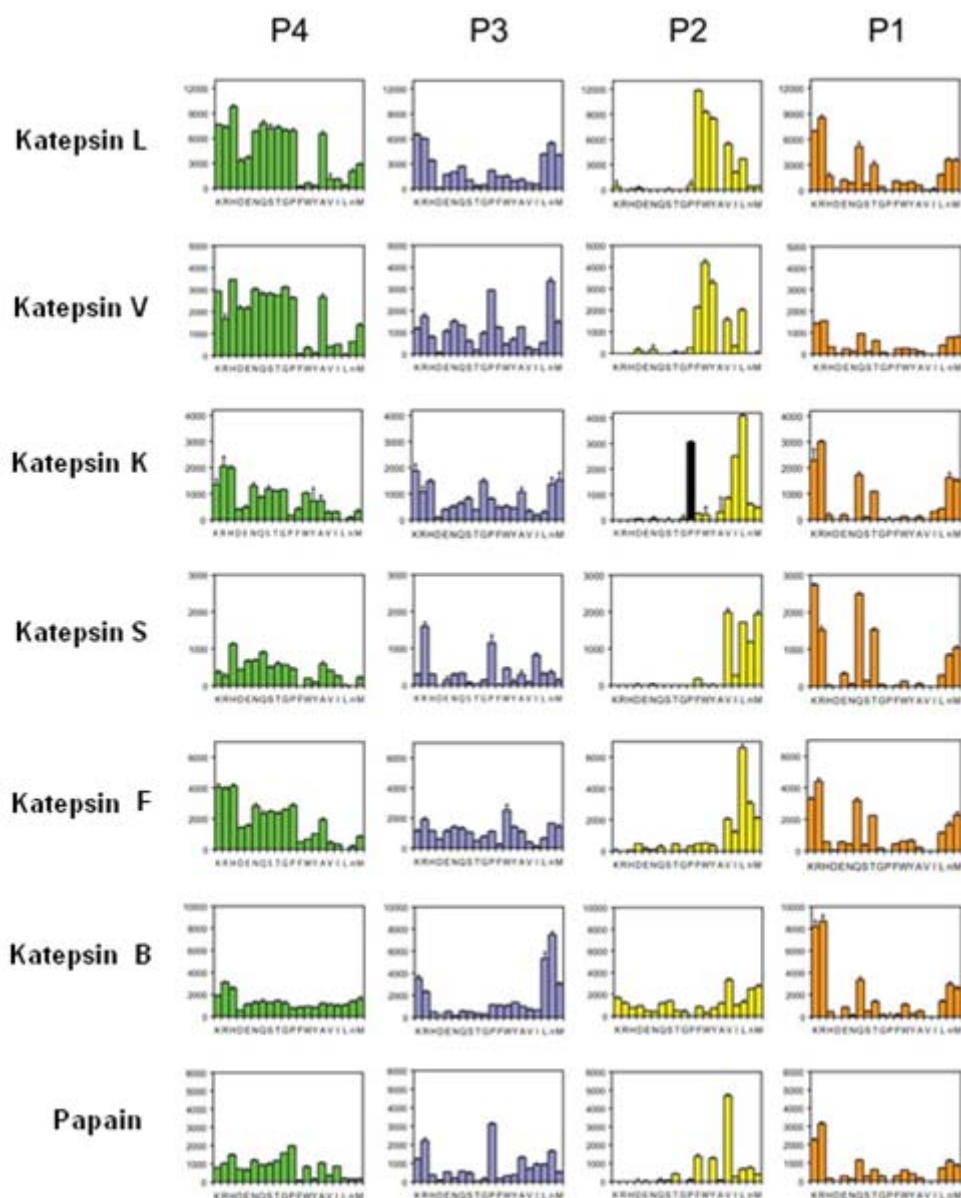
řetězců aminokyselin proteasy, tak postranní řetězce substrátu. Pouze podmísto S2 představuje jakousi kapsu. Interakce v podmístech S3 a S2' jsou méně významné a účastní se jich pouze postranní řetězce.⁸⁷



Obr. 1.17.: Schématické znázornění vazby substrátu do specifických vazebných podmíst proteasy. Vazebná místa proteasy jsou označována S1 – Sn pro vazbu substrátu směrem k jeho N-konci od štěpené vazby, směrem k C-konci jsou podmísta popisována S1'–Sn'. Obdobně jsou popisovány pozice na peptidovém řetězci substrátu, tedy P1–Pn a P1'–Pn'. Upraveno podle ⁸⁵.

U řady lidských cysteinových katepsinů byla ukázána preference bazických zbytků lysinu a argininu v pozici P1 a hydrofobních aminokyselin v pozici P2. V pozicích P3 a P4 je substrátová specifita širší.

Katepsin L preferuje v pozici P2 aromatické aminokyseliny, podobnou specifitu vykazuje i blízký homolog katepsinu L katepsin V. Naproti tomu u katepsinu S a katepsinu K byly v tomto místě preferovány alifatické aminokyseliny valin a leucin. Katepsin K navíc silně preferuje prolin a glycin v místech P2 a P3, což odpovídá jeho fyziologickému substrátu, kterým je kolagen. Katepsin F v pozici P2 a P3 jako jediný z katepsinů preferuje aspartát. Nejširší substrátovou specifitu v místě P2 vykazuje katepsin B a jako jediný z katepsinů zde akceptuje arginin (obr. 1.18., str. 34). Toho se využívá při návrhu substrátů specifických pro katepsin B. Velice podobná substrátová specifita byla nalezena i u parazitických cysteinových proteas jako cruzainu, rhodesainu, katepsinu L z parazitických prvoků rodu *Leishmania* nebo katepsinů B1 a B2 krevničky *Schistosoma mansoni*.



Obr. 1.18.: Substrátová specifita lidských katepsinů a papainu určená pomocí knihovny fluorogenních substrátů. Je uvedena specifita pro podmínky P1–P4. Na ose x jsou jednotlivé aminokyseliny, které byly pro danou pozici konstantní (zbylé pozice obsahovaly ekvimolární směs ostatních 19 aminokyselin). Aminokyseliny jsou znázorněny jejich jednopísmennými zkratkami. Pro unikátní specifitu katepsinu K pro prolin v pozici P2 je tato aminokyselina zobrazena černě. Na ose y je množství rozštěpeného substrátu v pikomolech za sekundu. Upraveno Podle ¹⁰⁷.

1.2.3.3. Struktura cysteinových katepsinů

První trojrozměrnou strukturou cysteinové proteasy vyřešenou pomocí rentgenové difrakce byla struktura papainu (vůbec první purifikovaná cysteinová proteasa izolovaná

z rostliny *Carica papaya*), která byla publikována v roce 1989.⁹² V devadesátých letech 20. století pak byly určeny struktury Katepsinů B, C, F, H, K, L, S, V a X.⁹⁹⁻¹⁰²

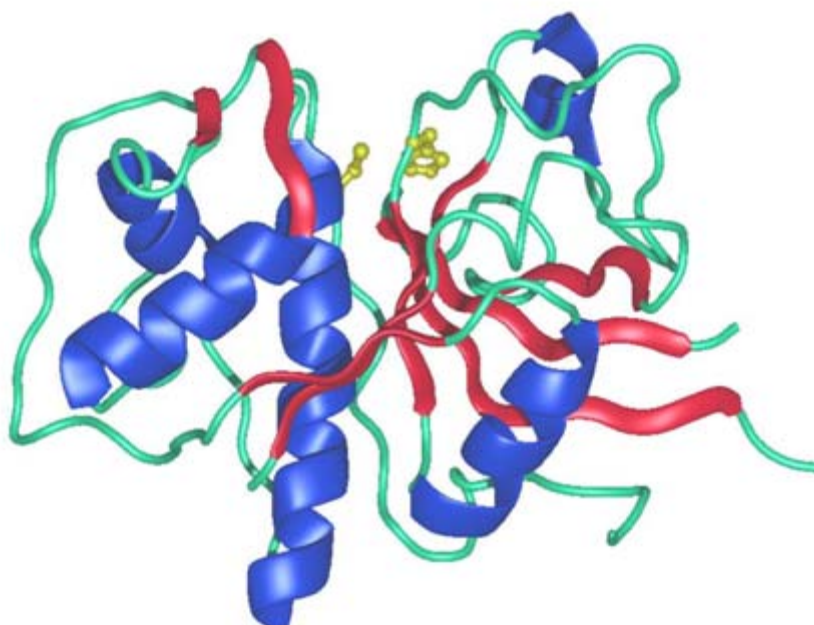
Na obr. 1.19. je porovnání sekvencí vybraných Katepsinů a papainu na základě trojrozměrné struktury. Patrná je konzervovanost katalytických zbytků Cys25, His 163 a Asn187 (číslování podle sekvence Katepsinu L) a zbytků zodpovědných za vazbu substrátu Gln19, Gly68, Trp183 a N-terminální Pro2.⁸⁷

		Smyčka 1.									
catL	1	APRSVDNRE	---	KG-Y---	---	VTPVKN	QG---	QCGSC	WAFSATGALE	QGMFRKTG--	-RLISLSEQN
catV	1	l.k.....K-	---	---K---	-k.v.....
catS	1	l.D.....-	---	..-C-	---E.Y	---	S..A.V....	a.LKL....	-k.v...A..
catK	1	..D...Y.K-	---	---	SV....	LMk....	-k.lN..P..
catF	1	..PEW...S-	---	..-A-	---K.d	---	M....v..Nv.	..W.LNQ--	-T.l....e
catB	1	l.A.F.A.-	---	---	---	S....	...G.VE.iS	DRICIH.N--	-VSvEv.Aed
catX	1	l.k.W...nV	DGV--	N.---	---	asITr.	.hIPQY...	..HAS.S.MA	DRINI.RKGA	WPSTL.V..	
catH	1	Y.P.M...K-	---	Nf--	---s....	---	S....	..T.T....	SAVAIA..	-kMl..A..q
catC	1	l.T.W...nV	HGI--	Nf--	---s..r.	.a--S....	YS.ASM.M.	aRIRIL.NNS	-QTPI..Pe	
pap	1	i.EY...q-	---	..-A-	---	---	S....VVTi.	..IIKIr...	-N.NQY...e
		Smyčka 2									
catL	53	LVDCSG-PQG	NEGCNGGLMD	YA-FQYVQDN	GGLDSE----	---	ESYPYEA	-----	-----	-----	-----
catV	53R-..	.q....F.A	R-....Ke.	---V.	-----	-----	-----	-----
catS	53TEKY.	.K....F.T	T-...iI.	K.i..d---	---	A....K.	-----	-----	-----	-----
catK	53VS--E	.d..G..Y.T	N-...K.	R.i.....	---	dA...VG	-----	-----	-----	-----
catF	53	..l.DK-M-	dKa.M..PS	N-ySAiKnL	...et.---	---	dD.S.qG	-----	-----	-----	-----
catB	57	.l.T.C.SM-C	Gd....YPA	E.-WnIWTRK	..-V.GGLYE	SHVGCR..S-	IPPCEHHVNG	SRPCTGEGD			
catX	62	vi..GN----	AGS.e..NDL	Sv-Wd.aHqH	..iPD.---	---	TCNN.q.	-----	-----	-----	-----
catH	54AQNF-N	.H..q...PS	Q.-e.iRY.	K.iMG.---	---	dt...KG	-----	-----	-----	-----
catC	58	v.S..Q--Y	Aq..e..FPY	LiAGK.a..F	..-VE.---	---	ACf..TG	-----	-----	-----	-----
pap	53	..l.DR--R	SY....YPW	S.-L.L.AqY	..iHYR----	---	nt....G	-----	-----	-----	-----
catL	94	TEESCKY---	-----	--N-----	-PKYSVANDT	GFVDIP----	-KQEKALMKA	VATVGPISVA			
catV	94	Vd.I.---	-----	--R-----	-EN...q..	..TVvA----	PGK.....				
catS	95	MdqK.Q.---	-----	--d-----	-S..Ra.TCs	KyTel.---	YGR.Dv.KE.	..NK..v..G			
catK	92	Q....M.---	-----	--.-----	-TGKa.KCR	.yRe.---	EGn...Kr.	..R..v..			
catF	92	HMq..Qf---	-----	-----	SAEKAKvYIQ	DS.elS----	-Qn.QK.AAW	l.KR.....			
catB	123	-TPK.SK---	-----	--ICEPGYSP	TY.QQKhYGY	NSYSvS----	-NS..Di.AE	iYKN..vEG.			
catX	99	KdqE.DKFNQ	CGTCNEFKEC	HAI-----	-RN.tlWRVG	DyGS1-----	-SGREKM.AE	iYAN....CG			
catH	95	QddH..f---	-----	-----	Q.DKaI.FVK	DVan.T---	MNd.E.MVE.	..LYN.v.F.			
catC	97	.dSP..M---	-----	--K-----	-EDCFRYYs	EyHYvGGFYG	GcN.AIMKLE	lvHH..MA..			
pap	91	VqRY.rS---	-----	--RE-----	-KGPyA.KTD	.VRqvQ----	PyNqG..LYS	i.-NQ.v..v			
		Smyčka 3									
catL	136	IDAGHESFLF	YKEGIYFEP-	-DCSSE--D-	---	M-----	-DHGVLVVGy	GFE--S----	TESDNNKYWL		
catV	137	M....S..Q.	..S.....K--n-	---	L-----GANSd	N---S....		
catS	138	v..R.P..FL	.rS.v.y..-	-S.tQ--n-	---	V-----	-n.....	.DL--N----	G---KE...		
catK	135	..SLT..Q.	.SK.v.ydE-	-S.N.d-n-	---	L-----	-n.a.a....	.Iq--K----	G---H.i		
catF	134	.n.--FGMQ.	.rH..SRPLR	PL..PW--L-	---	I-----	..a..l...	.QRS--D---	----VPf.a		
catB	172	Fsv-YSD..L	..S.v.QH--	-----	---	VTGEMM	GG.aiRil.W	.V.N--G----	----TP...		
catX	155	.M.-T.RLaN	.TG...A.YQ	-----	---	TTYI	-n.V.S.a.W	.ISD--G----	----TE..i		
catH	138	Fev-TnD..M	.rK...SST-	-S.HKTPDK-	---	V-----	-n.a.a....	.E.N--G----	----IP..i		
catC	144	Fev-YdD..H	..K...HHTG	--LRDPFNPF	ELT-----	---	-n.a..l...	.TdSA.G----	----MD..i		
pap	134	lq.aGKD.QL	.rG..fVG.C	--GN-----	-KV-----	---	..a.a.a...	.P-----	----N.I.		
		Smyčka 4									
catL	185	VKNSWGEENG	MGGYVKMAKD	RRN-----	---	HC	GIASAAASYPT	V			
catV	186P...S	SN....I...	kN.-----	---t....N.				
catS	182HnF.	EE..ir..rn	kG.-----	---FP...E	i			
catK	180	i.....n.	NK..iL..rn	kN.-----	---	A.	..Nl..f.K	M			
catF	179	i....Td..	EK..YYLhrG	S-G-----	---	A.	.vNtM..SAV	.D			
catB	215	.A...NTd..	DN.fF.IlrG	Q-d-----	---E.EvVAGI	PRTD			
catX	198	.r....P..	ER.WlrIv--	-----TSTYK	DGKGARY-NL	a.EEhCtFGD	PIV				
catH	184Pq..	.N..FLIErG	k------	---	M.	.l.AC....I	PLV			
catC	195TG..	EN..FrIRrG	T-d-----	---	E.	a.E.i.VAA.	PIPKL			
pap	173	i....TG..	EN..irIKrG	TG.SY-----	---	GV.	.lYtSSf..V	KN			

Obr. 1.19.: Porovnání sekvencí vybraných Katepsinů a papainu na základě jejich trojrozměrné struktury. Shodné zbytky jsou označeny tečkou, katalytické zbytky jsou označeny hvězdičkou. Šedě jsou vyznačeny zbytky tvořící jednotlivé smyčky účastnící se vazby substrátu. Převzato z ⁸⁷.

Cysteinové katepsiny zaujímají prostorovou strukturu typu papainu. Jedná se o globulární proteiny skládající se ze dvou domén – levé a pravé. Levá doména obsahuje tři α -helixy, z nichž nejdelší, tzv. centrální, je přes 30 aminokyselin dlouhý. V pravé doméně převažuje struktura β -skládaného listu. Ta tvoří β -barel, který je ve spodní části uzavřen α -šroubovicí. V horní části se obě domény oddalují a tvoří dutinu, ve které se nachází aktivní místo. To je tvořeno za přispění obou domén. Katalytický zbytek Cys25 se nachází na levé doméně v její N-terminální části, zatímco His163 je lokalizován v horní části β -barelu pravé domény (obr. 1.20.).

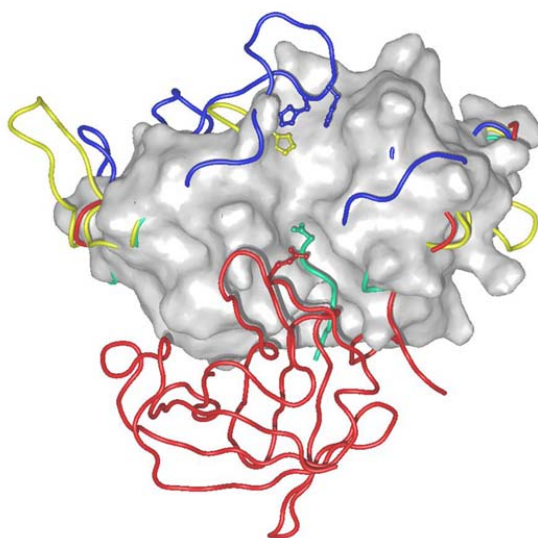
Aktivní místo má tvar rýhy a je obklopeno čtyřmi smyčkami, které jsou odpovědné za vazbu substrátu. Ten se do aktivního místa váže v rozvolněné (natažené) konformaci.⁸⁷



Obr. 1.20.: **Trojrozměrná struktura cysteinových katepsinů.** Jako příklad je uveden lidský katepsin L. Modře jsou znázorněny α -šroubovice, červeně β -skládané listy. Katalytické zbytky cystein a histidin jsou znázorněny žlutě. Převzato z⁸⁷.

Většina cysteinových katepsinů patří mezi endopeptidasy, existuje ale i několik cysteinových katepsinů vykazujících exopeptidasovou aktivitu. Katepsin X a C jsou pouze exopeptidasy. Katepsin X disponuje karboxypeptidasovou aktivitou, zatímco katepsin C je dipeptidyl aminodipeptidasa.^{94,102} Katepsin H je naproti tomu aminopeptidasa, katepsin B je endopeptidasa i karboxypeptidasa (dipeptidyl peptidasa).^{93,97} Krystalové struktury ukazují, že na rozdíl od katepsinů působících pouze jako endopeptidasy, mají katepsiny

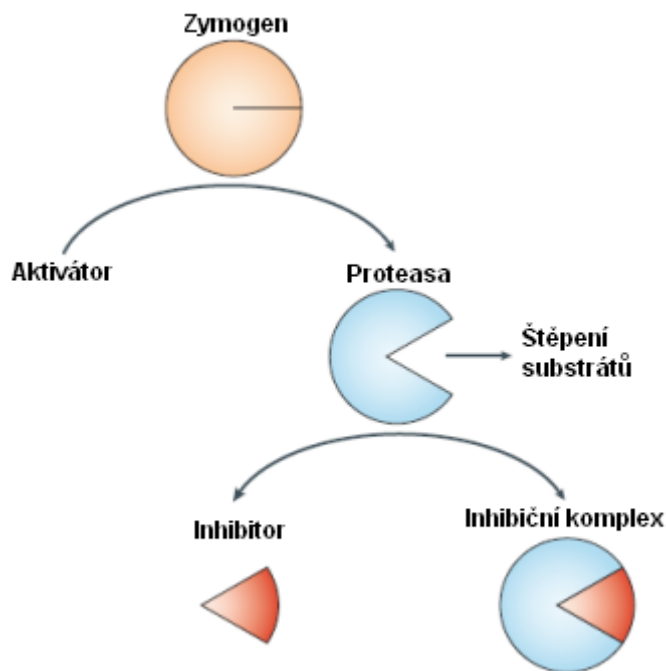
s exopeptidasovou aktivitou navíc strukturní elementy, které tuto aktivitu zapříčiňují (obr. 1.21.).^{93,94,97,102} Zatímco u endopeptidas je aktivní místo zcela otevřené, u exopeptidas je obklopeno strukturními elementy omezujícími počet vazných míst. U karboxypeptidas katepsinu B a katepsinu X tyto smyčky blokují část aktivního místa (vazebná podmísta S3' a S2') a obsahují histidiny, které váží koncové karboxylové skupiny štěpeného substrátu (tzv. "occluding loop" katepsinu B a tzv. "mini loop" katepsinu X, viz. obr. 1.21). Naproti tomu aminopeptidasy katepsin C a katepsin H využívají části svých propeptidů pro blokování části aktivního místa (vazebná podmísta S2, případně S1) a koncovou karboxylovou skupinou, případně karboxyly postranních řetězců, váží pozitivně nabitou N-koncovou aminoskupinu štěpeného substrátu.⁸⁷



Obr. 1.21.: **Strukturní elementy cysteinových katepsinů odpovědné za exopeptidasovou aktivitu.** Šedě je zobrazen povrch endopeptidasy katepsinu L a barevně přídavné segmenty u exopeptidas katepsinu B (modře), katepsinu X (žlutě), katepsinu H (zeleně) a katepsinu C (červeně). Převzato z ⁸⁷.

1.2.3.4. Regulace aktivity cysteinových katepsinů

Regulace aktivity proteolytických enzymů je pro buňku nezbytná, neboť v nesprávném místě nebo nesprávný čas může být tato aktivita pro buňku smrtelná. Aktivita katepsinových proteas je regulována na několika úrovních (obr. 1.22., str. 38).



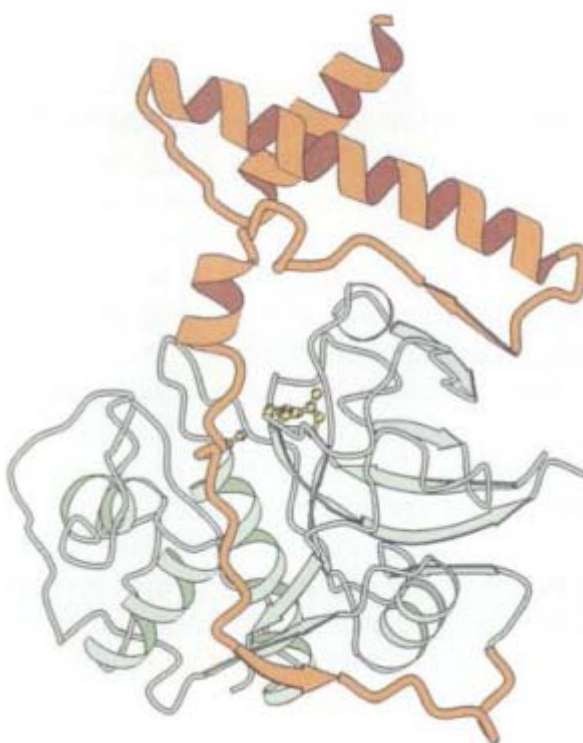
Obr. 1.22.: **Regulace aktivity proteas.** Na obrázku jsou schématicky znázorněny možnosti regulace aktivity proteas. Jedná se o regulaci na úrovni samotné aktivace proteasy z příslušného zymogenu anebo pomocí více či méně specifického inhibitoru. Převzato z ⁸⁵.

Aktivace zymogenu

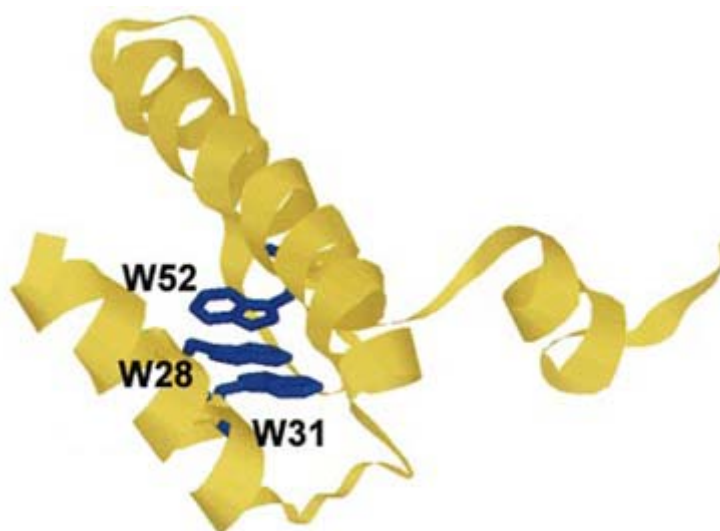
Katepsiny jsou syntetizovány ve formě neaktivních prekurzorů (proenzymů, zymogenů). Sekvence katepsinů obsahuje 3 části: N-koncový signální peptid (10–20 aminokyselin), propeptid (38–250 aminokyselin) a samotný proteolyticky aktivní enzym (220–260 aminokyselin). Aktivace proenzymu spočívá v proteolytickém odštěpení propeptidu. Syntéza proenzymu probíhá na membráně endoplazmatického retikula (kde dochází k odstranění signálního peptidu) a neaktivní proenzymy se po dodatečných úpravách v lumen endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu dostávají pomocí mannosy-6 fosfátového receptoru do lysozomů. Zde je kyselým pH způsobena disociace od receptoru, který je zpětně recyklován. Tato změna pH indukuje i aktivaci proenzymů na jejich aktivní formy.^{108–110}

Úkolem propeptidu je stericky bránit prohlubeň, ve které se nachází aktivní místo a bránit tak vstupu substrátu (obr. 1.23., str. 39). Propeptid katepsinu L je tvořen 75 aminokyselin dlouhou N-koncovou globulární doménou tvořenou třemi α -šroubovicemi. Jedna z těchto α -šroubovic obsahuje sekvenční motiv specifický pro proteasy typu katepsinu L – ER(F/W)N(I/V)N (takzvaný ERFNIN motiv). Pro stavbu této struktury jsou

zásadní tři tryptofanové zbytky tvořící hydrofobní jádro propeptidu (obr. 1.24., str. 40) a struktura je dále stabilizována několika solnými můstky. Pro správné ukotvení propeptidu je důležitá jedna z α -šroubovic hydrofobního jádra propeptidu, význam mohou hrát i elektrostatické interakce mezi propeptidem a zralým enzymem (obr. 1.25., str. 41). C-terminální část propeptidu je tvořena asi 20 aminokyselinami a připojuje propeptid k aktivní části enzymu. Propeptidy katepsinů jsou zároveň jejich poměrně účinnými inhibitory, což se využívá při návrhu peptidomimetických inhibitorů.^{110,111}

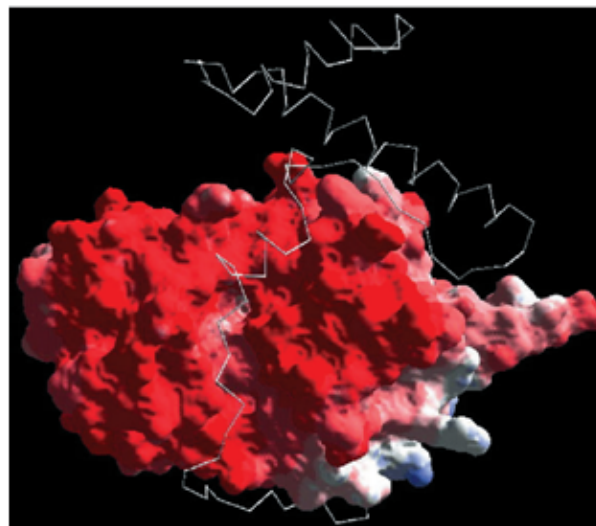
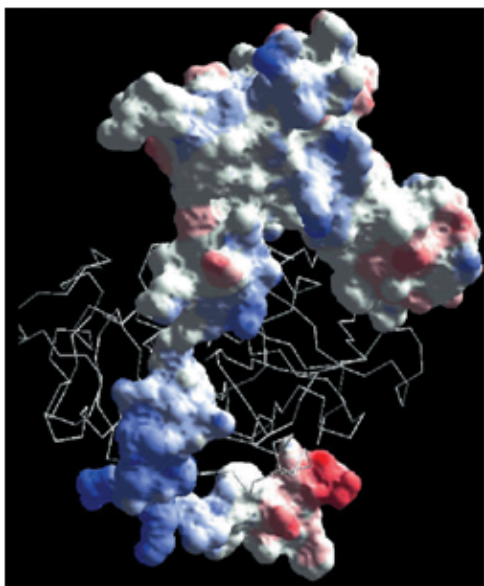


Obr. 1.23.: **Trojrozměrná struktura prokatepsinu L.** Oranžově je znázorněn propeptid, šedě zralý enzym, žlutě katalytické aminokyseliny. V propeptidu je patrná N-koncová globulární doména tvořená třemi α -šroubovicemi. Převzato z ¹¹¹.



Obr. 1.24.: **Stabilizace globulární domény propeptidu katepsinu S pomocí tří tryptofanových zbytků.** Žlutě je zobrazen průběh hlavního řetězce propeptidu, modře postranní řetězce tryptofanu (W28, W52, W31). Převzato z ¹¹⁵.

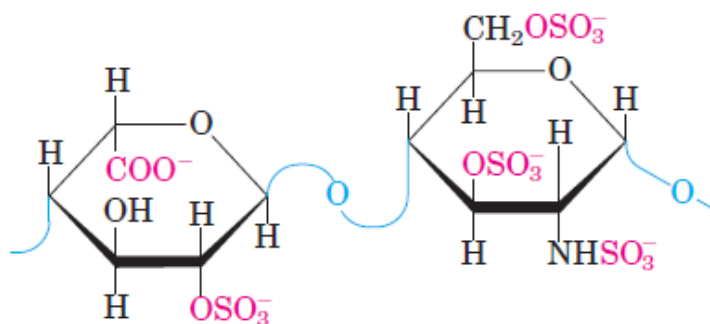
Schopnost intramolekulární autoaktivace (tedy schopnost autokatalyticky odštěpovat propeptid) v kyselém pH je zapříčiněna několika faktory. Jedním z nich je změna nábojových stavů některých aminokyselinových zbytků důležitých při interakci propeptidu a zralé části enzymu, což vede ke změně vzájemné orientace propeptidu a enzymu.^{111,112} Významnou roli při autoaktivaci hraje i fakt, že propeptid se v kyselém pH stává nestabilní a ztrácí svoji terciární strukturu. To snižuje schopnost interakce propeptidu se zralým enzymem a umožňuje autoaktivaci.¹¹³ Kromě intramolekulární aktivace může docházet i k aktivaci intermolekulární, kdy jsou molekuly proenzymu aktivovány molekulou již aktivované proteasy. Aktivace prokatepsinu L tak probíhá smíšeným unimolekulárním i bimolekulárním mechanismem.¹¹⁴



Obr. 1.25.: Elektrostatický potenciál povrchu propeptidu katepsinu L ve struktuře zymogenu (vlevo) a zralého katepsinu L s odštěpeným propeptidem (vpravo). Červená barva značí záporný elektrostatický potenciál, bílá neutrální a modrá kladný. Převzato z ¹¹⁶.

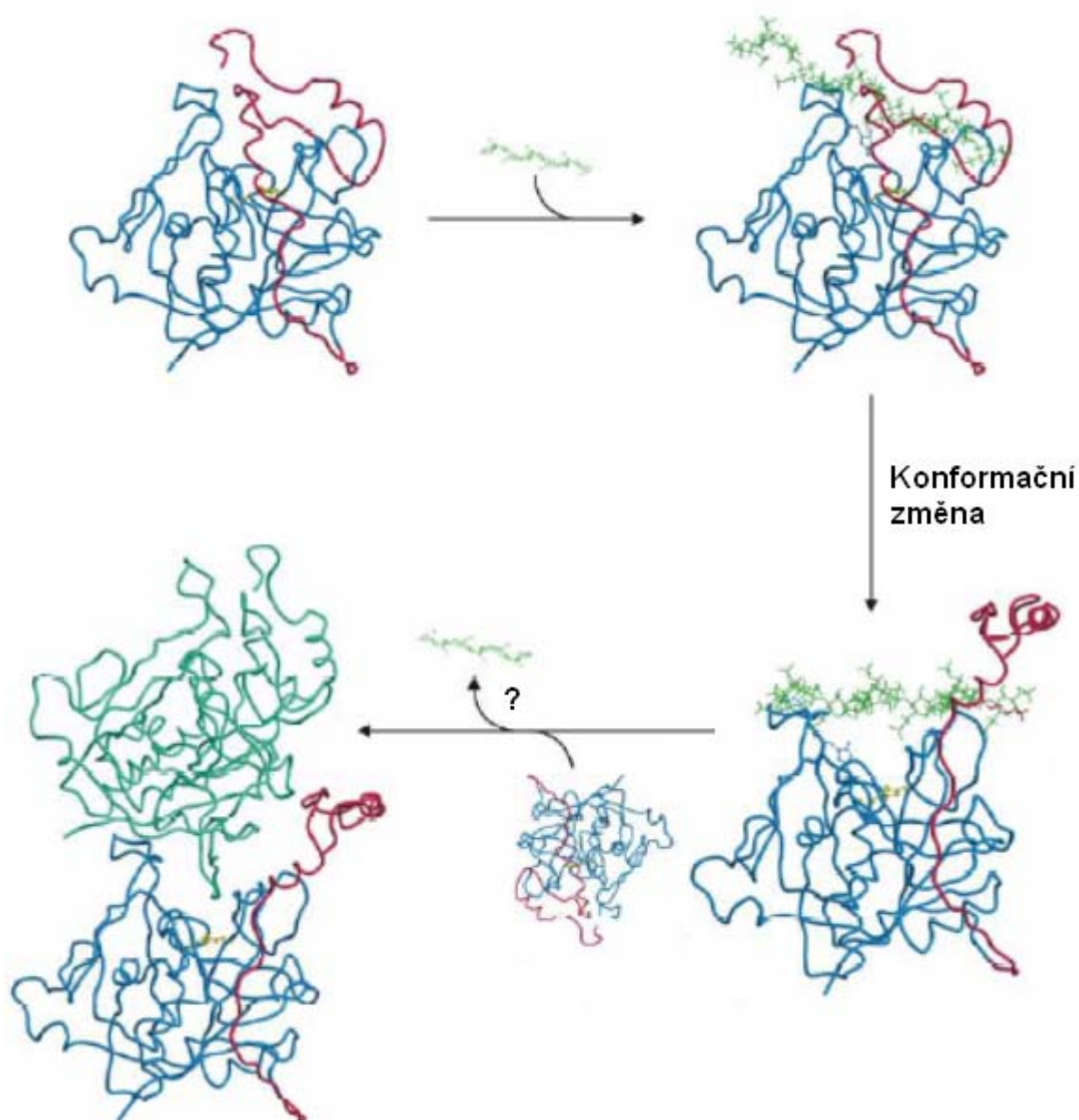
Modulace aktivity katepsinů pomocí glykosaminoglykanů

Modulace aktivity katepsinových proteas probíhá též prostřednictvím glykosaminoglykanů. Glykosaminoglykany (GAG), též mukopolysacharidy jsou nerozvětvené heteropolysacharidy složené ze střídajících se jednotek uronových kyselin a hexosaminových zbytků. Jsou složkou mnoha tkání, zejména pojivových (chrupavky, šlachy, cévní stěny atd.). Jejich hlavním znakem je přítomnost záporného náboje, jehož nositelem je karboxylová skupina nebo zbytek kyseliny sírové v případě sulfatovaných glykosaminoglykanů. Typickými zástupci jsou hyaluronová kyselina, chondroitin sulfát nebo heparin (obr. 1.26., str. 42). GAG mohou být velice efektivními modulátory aktivity cysteinových katepsinů a mechanismy jejich působení jsou komplexní.¹¹⁷



Obr. 1.26.: **Strukturní vzorec disacharidové jednotky heparinu.** Upraveno podle ¹¹⁷.

Jedním ze způsobů regulace aktivity katepsinů je vliv GAG na aktivaci jejich zymogenů. U lidského katepsinu L GAG urychlují aktivaci a mohou indukovat schopnost degradovat matrixové proteiny (laminin, fibronectin). Mechanismus ovlivnění aktivace prokatepsinu L byl studován s heparinem. Ten se při pH 5 váže na sekvenční motiv BBXB (B značí bazickou aminokyselinu), přítomný v sekvenci propeptidu katepsinu L. Tato vazba silně destabilizuje strukturu propeptidu, zatímco struktura zralého enzymu není ovlivněna. Destabilizací se propeptid stává lepším substrátem katepsinu L.^{118,119} Urychlení aktivace proenzymu vlivem GAG bylo ukázáno i u lidského prokatepsinu B, a byl navržen podobný mechanismus aktivace: po vazbě GAG dochází k destabilizaci propeptidu, který podléhá konformační změně, z prokatepsinu B se tak stává lepší substrát a zároveň se odhaluje jeho aktivní místo. Komplex prokatepsin B-GAG je poté štěpen bi-molekulárním mechanismem jiným komplexem stejného složení. Po aktivaci GAG disociuje a může se vázat na jinou molekulu prokatepsinu B (obr. 1.27., str. 43).¹²⁰

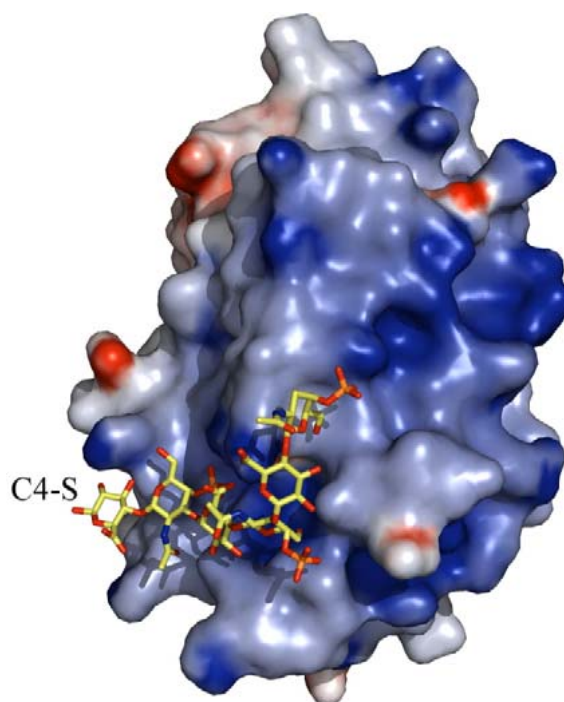


Obr. 1.27.: **Mechanismus aktivace prokatepsinu B v přítomnosti glykosaminoglykanů (GAG).** Molekula GAG (zelená) se váže na propeptid katepsinu B (červená, zralý enzym modrá) pomocí elektrostatických interakcí, dochází ke konformační změně, což má za následek odkrytí aktivního místa a štěpení substrátu v podobě jiného komplexu prokatepsin B (tyrkysová)–GAG. Převzato z ¹²⁰.

Vliv GAG na aktivaci zymogenu byl popsán i u dalších katepsinů, např. katepsinu K a katepsinu S.^{121,122}

U katepsinu K je významná jeho interakce s GAG, neboť v jejich přítomnosti se zvyšuje kolagenolytická aktivita katepsinu K, která je potřebná pro plnění jeho fyziologické funkce při přestavbě kostní tkáně. Krystalová struktura komplexu katepsin K – chondroitin-4-sulfát (Ch4S) ukazuje, že GAG se váže na kladně nabitou část povrchu katepsinu K, která je odvrácená od aktivního místa, a že jedna molekula katepsinu

K interaguje s jedním hexasacharidem C4S (obr. 1.28.). Struktura aktivního místa však vazbou Ch4S není ovlivněna.^{123,124}



Obr. 1.28.: **Krystalová struktura komplexu katepsinu K s hexasacharidovým fragmentem chondroitin-4-sulfátu (Ch4S).** Zobrazen je elektrostatický potenciál povrchu katepsinu K (červená – záporný, bílá – neutrální, modrá – kladný), který je převážně kladný a váže tak záporně nabitý hexasacharid Ch4S. Aktivní místo katepsinu K je na odvrácené straně. Převzato z ¹²³.

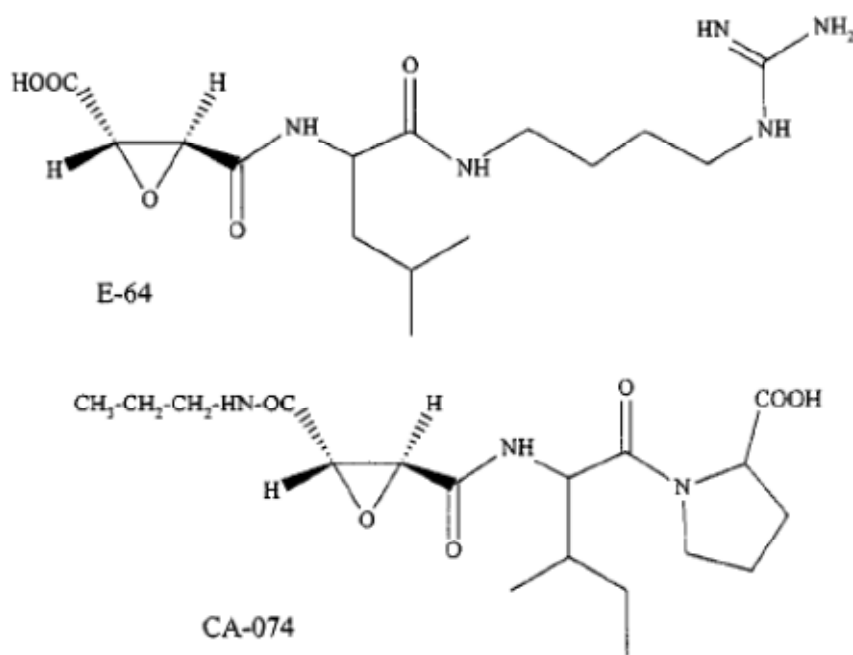
Vazba GAG na katepsin K může stimulovat i jeho elastinolýtickou aktivitu a dokáže stabilizovat jeho trojrozměrnou strukturu při fyziologickém pH.¹²⁵

Studie naznačují různé způsoby vazby různých GAG na cysteinové katepsiny, s čímž souvisí i pestrá paleta efektů, které tato vazba může vyvolat.

Modulace aktivity katepsinů pomocí nízkomolekulárních inhibitorů

Prvním objeveným nízkomolekulárním inhibitorem cysteinových katepsinů byl inhibitor E-64 (L-trans-epoxysukcinyl-leucylamido(4-guanidino)butan). Objeven byl v roce 1978 a poprvé byl izolován z plísně *Aspergillus japonicus*. Jedná se o epoxysukcinylový derivát, který selektivně alkyluje sulfhydrylovou skupinu aktivního cysteinu. Je tak kovalentním ireversibilním inhibitorem cysteinových proteas papainového typu (obr. 1.29., str. 45).^{126,87}

Na základě této struktury byly syntetizovány selektivní inhibitory katepsinu B: CA-030 a CA-074 (obr. 1.29.). Jejich selektivita je založena na vazbě do S1' a S2' vazebných podmíst katepsinu B, kde je peptidová kostra inhibitoru ukotvena prostřednictvím interakce karboxylové skupiny prolinu se dvěma histidiny přítomnými v tzv. "occluding loop" – charakteristickém strukturním prvku katepsinu B.^{127,128} Následně byly připraveny analogické struktury, které selektivně inhibovaly katepsin L a katepsin S. Jedná se o tzv. CLIK sérii inhibitorů (podle svého objevitele z angl. Cathepsin L inhibitor Katunuma).¹²⁹



Obr. 1.29.: Struktura inhibitoru cysteinových katepsinů E-64 a selektivního inhibitoru katepsinu B CA-074. Upraveno podle ¹²⁸.

Další skupinou nízkomolekulárních inhibitorů jsou aldehydy. Prvním objeveným přirozeným inhibitorem tohoto typu byl leupeptin (produkovaný aktinobakteriemi). Nevýhodou aldehydů je nízká selektivita, neboť reagují jak s cysteinovými, tak se serinovými proteasami a nejsou proto příliš využívány. Jsou reversibilními inhibitory.⁸⁷

V současné době však existuje velké množství reaktivních skupin, které mohou být využity při konstrukci inhibitorů cysteinových katepsinů. Patří mezi ně např.: acyloxymethyl ketony, vinyl sulfony, allyl sulfony, nitrily a další.¹³⁰

Modulace aktivity katepsinů pomocí vysokomolekulárních inhibitorů

Mezi vysokomolekulární inhibitory cysteinových katepsinů patří zejména jejich endogenní proteinové inhibitory – cystatiny, serpiny a thyropiny. Ty se většinou pevně váží do aktivního místa (K_i až 10 fM) molekuly enzymu a brání tak vstupu substrátu. Můžeme je podle jejich fyziologické role rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou inhibitory, které inaktivují proteasy přítomné v jiných kompartmentech, než kde by měly primárně působit a kde tak může být jejich aktivita pro buňku nebezpečná. Sem patří především cystatiny a thyropiny. Druhá skupina inhibitorů má funkci regulační. Většinou se nachází ve stejných kompartmentech jako jejich cílové proteasy. Jejich úkolem je udržet zde proteolytickou aktivitu ve fyziologických mezích a zamezit nekontrolované proteolyse (například při nedostatku fyziologického substrátu).⁸⁷

Významnou skupinou inhibitorů cysteinových katepsinů jsou cystatiny. Dělí se podle počtu cysteinových domén (obvykle 1-3) a přítomnosti disulfidových můstků na stefiny, cystatiny a kininogeny. Stefiny (obr. 1.30., str. 47) jsou jednořetězcové, cytosolické molekuly bez disulfidových můstků o velikosti přibližně 10 kDa. Cystatiny jsou také jednořetězcové molekuly o velikosti přibližně 10-12 kDa, ale jsou sekretovány do extracelulárního prostoru a obsahují dva konzervované intramolekulární disulfidové můstky. Kininogeny jsou prekurzory biologicky aktivních kininů, molekul přítomných v krvi. Dělí se na vysokomolekulární a nízkomolekulární kininogeny. Obsahují několik cystatinových domén, těžký a lehký řetězec. Zatímco těžký řetězec je pro obě skupiny identický, lehký řetězec vysokomolekulárních kininogenů je výrazně delší. Vysokomolekulární kininogeny tak nabývají molekulových hmotností kolem 84 kDa, zatímco nízkomolekulární přibližně 51 kDa.

Další skupinou inhibitorů katepsinových proteas jsou thyropiny. Typickým zástupcem je equistatin. Ten je sekvenčně příbuzný s tyreoglobulinovými doménami typu 1 a odtud je odvozen i jejich název. Obsahuje tyto domény: N-terminální doména je odpovědná za inhibici cysteinových proteas papainového typu, zatímco druhá doména způsobuje inhibici katepsinu D (aspartátová proteasa). Mezi vysokomolekulární inhibitory cysteinových katepsinů patří i serpiny. Přestože jsou převážně inhibitory serinových proteas, některé serpiny inhibují i cysteinové proteasy (např. serpin CrmA).^{87,131}



Obr. 1.30.: Krystalografická analýza vazby cystatinu Stefinu A (modrá) do aktivního místa katepsinu H (červená). Molekula inhibitoru interaguje s enzymem pomocí tří strukturních segmentů Převzato ze ¹³¹.

1.2.2.7. Katepsin L

Katepsin L byl poprvé popsán v roce 1971, jako enzym izolovaný z krysích jaterních lysosomů, který je schopen degradovat proteiny.¹⁵⁴ Struktura katepsinu L je typická pro cysteinové katepsiny. Enzym je složen ze dvou domén, na jejichž rozhraní se nachází aktivní místo (kap. 1.2.3.3.). Substrátová specifita lidského katepsinu L je široká, typická je pro něj preference aromatických a hydrofobních aminokyselin v pozici P2 (kap. 1.2.3.2.).⁹⁹ Maximální proteolytickou aktivitu vykazují savčí katepsiny L vzhledem ke své lokalizaci v lysosomech v kyselé oblasti pH 5,5-6,5.¹⁵⁵

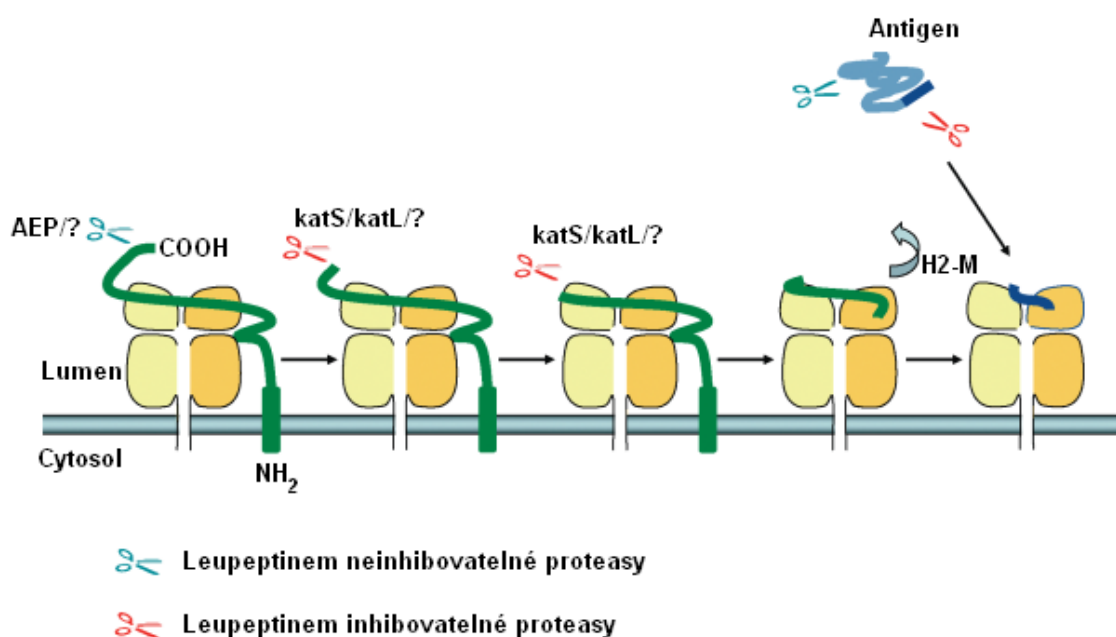
Přestože hlavním úkolem katepsinu L je nespecifická degradace proteinů v lysosomech (stejně jako u ostatních katepsinů), byly též popsány jeho specifické fyziologické funkce a nezanedbatelná role v některých patologických procesech, jak je uvedeno dále.

Fyziologické funkce katepsinu L

Jednou z důležitých funkcí katepsinu L je účast při dějích souvisejících s imunitní odpovědí a její regulací. Hraje například roli při prezentaci antigenu pomocí MHC glykoproteinů druhé třídy (MHC II). MHC II jsou povrchové glykoproteiny antigen prezentujících buněk, které vystavují peptidové antigeny pro potenciální rozeznání

T-lymfocyty. Tato kaskáda dějů vede ke spuštění specifické imunitní odpovědi. MHC II váží v endoplasmatickém retikulu do svého vazebného místa takzvaný invariantní řetězec. Tento peptid zajišťuje stabilitu molekuly MHC II během transportu do lysozomu, kde je poté proteolyticky degradován a molekula MHC II následně váže peptid určený k prezentaci. Bylo prokázáno, že při proteolytické degradaci invariantního řetězce hraje významnou roli právě katepsin L (obr. 1.31.).¹³²

Další rolí katepsinu L v regulaci imunity je proteolytická aktivace interleukinu 8, který je hlavním chemotaktickým faktorem neutrofilů.¹³³



Obr. 1.31.: **Degradace invariantního řetězce v lysosomech.** Jsou ukázány proteasy podílející se na proteolytické degradaci invariantního řetězce (zelená) a prezentaci antigenu (modrá) pomocí MHC II (žlutá, béžová). AEP – asparaginylní endopeptidasa; katS – katepsin S, katL – katepsin L; H2-M – molekula účastnící se vazby antigenu. Převzato z¹³².

Katepsin L se také účastní proteolytické aktivace některých prohormonů a neurotransmiterů. Například klíčovou proteasou při aktivaci peptidového neurotransmiteru a neuroendokrinního hormonu neuropeptidu Y (NPY) z jeho neaktivní formy proNPY.¹³⁶ Dalším specifickým substrátem z řad neurotransmiterů a prohormonů je proenkefalin. Jeho aktivní forma enkefalin je významná při přenosu nervového signálu a mezibuněčné signalizaci. Aktivace proenkefalinu probíhá proteolyticky za účasti katepsinu L.¹³⁷

Také apoptosa je nepřímo regulována lysosomálními proteasami včetně

katepsinu L. Do této regulace se lysosomální katepsiny (zejména cysteinové katepsiny B, L, S a K) zapojují díky své schopnosti štěpit některé klíčové regulační proteiny apoptosy jako Bcl-2 nebo Bid.¹³⁸

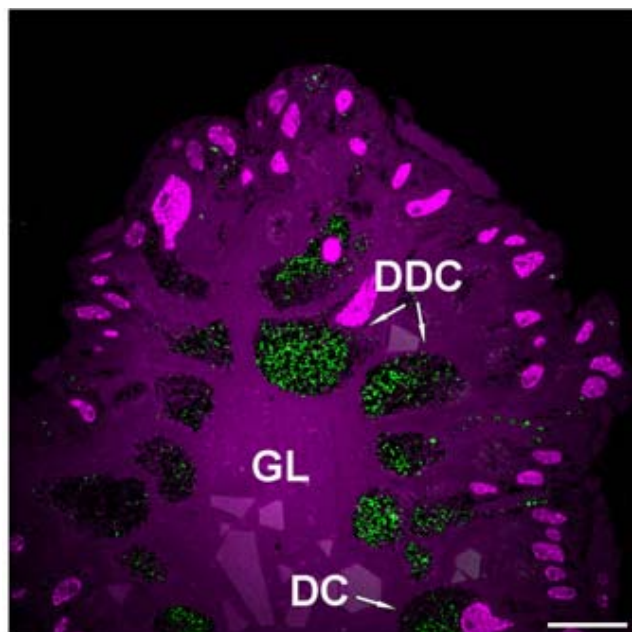
Kromě lysosomální formy katepsinu L byla nalezena i jaderná forma. U této formy probíhá alternativní translace, kdy nedochází k syntéze signálního peptidu. Jaderný katepsin L například participuje na regulaci buněčného cyklu, kde je odpovědný za štěpení transkripčního faktoru CDP/Cux. Ten se účastní regulace přechodu mezi G1 a S fází.¹³⁴ Jaderný katepsin L hraje taktéž roli v epigenetické regulaci při diferenciaci myších kmenových buněk. Epigenetická regulace je založena na kovalentních modifikacích histonů a katepsin L je schopný proteolyticky modifikovat N-terminální část histonu H3.¹³⁵

Katepsin L v patofyziologii

Role katepsinu L byla popsána při rozvoji některých patologických stavů, z nichž nejvýznamnější je pravděpodobně participace na migraci rakovinných buněk. Těchto dějů se účastní řada cysteinových proteas včetně katepsinu L. Katepsin L je významný zejména při lysosomální degradaci extracelulární matrix, což nádoru usnadňuje progresi.^{139,140} Existují i práce popisující podíl především katepsinu L a katepsinu B na patogenezi revmatoidní artritidy, což je autoimunitní onemocnění kloubů.⁸⁷

Katepsin L klíštěte obecného

Podle analogie s klíštětem *I. scapularis*, lze i u katepsinu L klíštěte *I. ricinus* očekávat až tři isoenzymy.¹⁴¹ Katepsin L1 z klíštěte obecného (IrCL1) se výrazně podílí na degradaci hemoglobinu, jakožto hlavního zdroje živin klíštěte obecného. Účastní se jak úvodní fragmentace hemoglobinu, tak štěpení velkých fragmentů na menší peptidy (viz. kap.1.1.4.). Jeho exprese je nejvyšší 4.–6. den sání, poté prudce klesá a v dalších fázích trávení klíště využívá zásoby IrCL exprimované během sání.¹³



Obr. 1.32.: **Lokalizace IrCL1 ve střevě klíštěte obecného.** Imunohistochemický snímek řezu střevem klíštěte obecného. Specifický signál IrCL1 (zelená) je lokalizován pouze uvnitř trávících buněk. Pro vizualizaci byly využity specifické králičí protilátky proti IrCL1. DDC – odloučené trávící buňky, DC – trávící buňky, GL – lumen střeva. Převzato z ¹⁴¹.

IrCL1 je lokalizován především v trávících střevních buňkách (obr. 1.32.). Inhibice exprese IrCL1 pomocí RNA interference narušuje klíšťatům schopnost sání, a proto může být tento enzym potenciálním cílem terapeutického zásahu.¹⁴¹

Trojrozměrná struktura IrCL dosud není známa.

2. Cíle práce

Klíště obecné *I. ricinus* je v Evropě nejvýznamnější druh klíštěte, který se účastní přenosu patogenů na člověka. Při trávení proteinů z krve hostitele hrají důležitou roli katepsinové proteasy klíštěte včetně katepsinu L. Tyto proteiny jsou zajímavé jako antigeny pro vývoj protiklístěcích vakcín. Tato práce se zabývá analýzou proteolytické aktivity dvou isoenzymů katepsinu L - IrCL1 a IrCL3.

Řešeny budou následující dílčí úkoly:

- Pomocí místně specifické mutagenese připravit konstrukty pro expresi IrCL1 s modifikovanými glykosylačními sekvencemi.
- Exprimovat rekombinantní IrCL1 v kvasinkách *P. pastoris* a purifikovat jej.
- Analyzovat proteolytickou aktivitu IrCL1, zejména substrátovou specifitu a možnosti regulace aktivity glykosaminoglykany. Porovnat proteolytickou aktivitu plně glykosylované formy IrCL1 a modifikované formy IrCL1 s redukovanou glykosylací.
- Refoldovat IrCL3 exprimovaný v *E. coli* a analyzovat způsob jeho aktivace.
- Porovnat proteolytickou aktivitu IrCL3 a IrCL1.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

Homogenát střevní tkáně klíštěte *I. ricinus* a konstrukt obsahující sekvenci katepsinu L1 z klíštěte obecného (IrCL1) zaklonovanou do plasmidu pPICZα B byl poskytnut Dr. Petrem Kopáčkem (Parazitologický ústav AV ČR).

Katepsin L3 z klíštěte *I. ricinus* (IrCL3) exprimovaný v *E. coli* byl ve formě frakce z niklové afinitní chromatografie taktéž poskytnut Dr. Petrem Kopáčkem.

Buňky *Pichia pastoris* (kmen X33), *E. coli* TOP10 - Invitrogen

3.1.2. Chemikálie

3.1.2.1. Kultivační media

LB (Luria-Bertani) medium: 1 % trypton 0,5 % kvasinkový extrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0

LB/Z medium: LB médium, 25 µg.ml⁻¹ zeocin

YPD (yeast, pepton, dextrose): 1 % kvasinkový extrakt, 2 % pepton, 2 % dextrosa

YPDS/Z agar: YPD medium, 1 M sorbitol, zeocin (100 µg.ml⁻¹), 2 % agar.

BMG: 0,1 M Na-fosfát, pH 6,0, 1,34 % YNB, 4x10⁻⁵ % biotin, 1 % glycerol

BMM: 0,1 M Na-fosfát, pH 6,0, 1,34 % YNB, 4x10⁻⁵ % biotin, 0,5 % methanol

3.1.2.2. Substráty

Bachem, Švýcarsko:

Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (Boc-QAR-AMC), Bz-Phe-Val-Arg-AMC (Bz-FVR-AMC); Z-Phe-Arg-AMC (Z-FR-AMC); Z-Arg-Arg-AMC (Z-RR-AMC); Boc-Val-Leu-Lys-AMC (Boc-VLK-AMC), Suc-Leu-Thr-Amc (Suc-LT-AMC), Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC), Suc-Ala-Ala-Phe-AMC (Suc-AAF-AMC), Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (Suc-AAPF-AMC)

3.1.2.3. Inhibitory

Sigma, USA:

E-64, S-methylmethanthiosulfonát (SMMTS)

BoRC – syntetizován Dr. Nussbaumerovou (ÚOCHB AV ČR)

3.1.2.4. Komerční soupravy

Quiagen, Německo:

Plasmid Mini Kit, Plasmid Midi Kit, Quick Gel Extraction Kit

Thermo Scientific, USA:

BCA Protein Assay Kit

3.1.2.5. Ostatní chemikálie

Sigma, USA:

dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'tetramethylethyldiamin (TEMED), akrylamid, lidský hemoglobin (hHb), lidský sérový albumin (HSA), citrát sodný, heparin, chondroitin-6-sulfát, dextran sulfát, biotin, sorbitol, LB agar, LB medium, YPD agar, dithiotreitol (DTT), dimethylsulfoxid (DMSO), N,N'methylenbisakrylamid, polyethylenglykol 1500 (PEG 1500), trichloracetát, Coomassie Brilliant Blue, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), peroxodisíran amonný (APS)

Lach-Ner, ČR:

chlorid sodný, hydroxid sodný, k. octová, bromfenolová modř, hydrogenfosforečnan sodný, acetonitril, bromfenolová modř, glycerol, methanol, ethanol

Fermentas, Lotyšsko:

Hmotnostní standardy pro SDS PAGE - Page Ruler Prestained Protein Molecular Weight Marker

Invitrogen, USA:

Buňky *E. coli* TOP10, *P. pastoris* (kmen X33), SOC medium, Zeocin, Yeast nitrogen base (YNB)

Bio-Rad, USA:

Agarosa

New England Biolabs:

NEB I pufr, , restrikční endonukleasy *SacI*, *DpnI*

Promega, USA:

Pfu DNA polymerasa

3.2.Přístroje a vybavení

Analytické váhy XA 82/220/2X - Radwag, Polsko

Předvážky Mettler Toledo - Mettler, Švýcarsko

Centrifugy:

Micro Centrifuge - Carl-Roth, Německo

Heraeus - Biofuge, Velká Británie

Avanti J30I - Beckman Coulter, USA

Vakuová odparka Speed Vac Concentrator - Thermosavant, USA

Filtr Hydrophilic PES 0,22 µm - Millipore, USA

UltrafreeMC Microcentrifuge filter 0,22 µm - Millipore, USA

Fluorescenční/absorbanční čtečka Infinite M1000 - Tecan, Rakousko

Fluorescenční scanner Typhoon - GE Healthcare Life, Švédsko

pH metr Orion DualStar - Thermo Scientific, USA

Termoblok - TS-100C - Biosan, Lotyšsko

Vortex LTM2 - Vývojové dílny ČSAV

Vertikální elektroforéza - BioRad, USA

Blotovací zařízení - BioRad, USA

FPLC ÄKTA Purifier - GE Healthcare Life, Švédsko

HPLC Agilent 1200 Series - Agilent Technologies, USA

spektrofotometr BioSpectrometer – Eppendorf, Francie

konduktometr Dual Star - Thermo Scientific, USA

inkubátor QBD4 - Grant, UK

orbitální třepačka Innova44 - New Brunswick Scientific, USA

Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA

automatické pipety – Gilson, Francie

koncentrátor Amicon Ultra (cut off 10 000 Da) - Millipore, USA

Kolony a nosiče:

MonoS HR 5/5 - GE Healthcare Life, Švédsko

Sephadex G25 - Amersham Biosciences, USA

Superdex 75 - Amersham Biosciences, USA

3.3. Metody

3.3.1. Rekombinantní exprese v *Pichia pastoris*

3.3.1.1. Místně specifická mutageneze

Konstrukt obsahující sekvenci katepsinu L1 z klišťete obecného (IrCL1) zaklonovanou do plasmidu pPICZ α B byl poskytnut Dr. Petrem Kopáčkem (Parazitologický ústav AV ČR).

V tomto konstruktu byla provedena mutageneze N-glykosylačních míst IrCL1 predikovaných programem NetNGlyc 1.0.¹⁴⁵ Zbytky threoninu T212 a T295 obsažené v glykosylačních signálech byly nahrazovány za alanin (mutace T212→A a T295→A).

Mutageneze byla provedena pomocí metody PCR za využití primerů obsahujících mutaci a DNA polymerasy *Pfu*. Tímto postupem byly postupně připraveny tři konstrukty IrCL1: 1) konstrukt obsahující mutaci T212A (IrCL1-T212A), 2) konstrukt s mutací T295A (IrCL1-T295A) a 3) konstrukt obsahující obě mutace (IrCL1-T212A-T295A).

Návrh primerů

Oligonukleotidové primery, obsahující mutace T212A a T295A, byly navrženy pomocí programu QuickChange (Tab. 3.1., str. 56).¹⁴⁶

Tab. 3.1.: **Primery navržené pomocí programu QuikChange pro zavedení mutací T212A a T295A v sekvenci IrCL1.** Mutované místo je zobrazeno červeně, modře je znázorněn odpovídající primer. T_m – teplota tání

Název primeru	Počet bazí	T _m	Sekvence primeru (5'→3')
T212A	27	78.61°C	5'-ccccataaatggcgcgacggcacttg-3'
T212A - reverzní	27	78.61°C	5'-caagtgccgtccgcgccattgtagggg-3'
T295A	29	78.81°C	5'-gcaccctcaacggcgctgactactgggttc-3'
T295A - reverzní	29	78.81°C	5'-gaaccagtagtcagcgccgttgaggggtgc-3'

Primer-templát:

T212A	5'-cccctacaatggcgcgacggcacttg-3' gatggggatgttacccgctgcctgccgtgaacggt ctaccctacaatggcaggacggcacttgcca
T212A - reverzní	3'-ggggatgttacccgctgcctgccgtgaac-5'
T295A	5'-gcaccctcaacggcgctgactactgggttc-3' tgccgtgggagttgccgtgactgatgaccaagcag acggcaccctcaacggcactgactactgggttcgtc
T295A - reverzní	3'-cgtgggagttgcccgactgatgaccaag-5'

Amplifikace DNA metodou PCR

Obsah směsi pro PCR reakci o celkovém objemu 50 µl:

- 1 µl DNA (45 ng vektoru pPICZα B obsahujícího gen pro IrCL1)
- 1 µl směsi dNTP (10 mM každý dNTP)
- 1,5 µl 10 µM přímého primeru (T212A přímý nebo T295A přímý)
- 1,5 µl 10 µM reverzního primeru (T212A-reverzní nebo T295A-reverzní)
- 5 µl komerčního pufru pro *Pfu* DNA polymerasu
- 1 µl *Pfu* DNA polymerasy
- 39 µl sterilní H₂O

PCR reakce probíhala v termocykleru podle následujícího postupu:

- 1) Počáteční denaturace DNA: 95 °C/ 30 s
 - 2) Denaturace DNA: 95 °C/ 30 s
 - 3) Připojení primerů: 55 °C/ 1 min
 - 4) Extenze primerů: 68 °C/ 5 min
- Kroky 2 - 4 byly opakovány 18x
- 5) Závěrečná extenze: 68 °C/ 5 min

Komerční pufr pro DNA polymerasu Pfu: 200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg.ml⁻¹, BSA, pH 8,8

Odstranění templátové DNA

Templátová DNA neobsahující požadovanou mutaci byla odstraněna rozštěpením restriční endonukleasou *DpnI*. K reakční směsi po PCR bylo přidáno 2,5 µl roztoku *DpnI* a směs byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

3.3.1.2. Transformace kompetentních buněk

K 25 µl buněk *E. coli* TOP10 byl přidán 1 µl reakční směsi po štěpení *DpnI*. Tato směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 30 s. Následně bylo přidáno 230 µl SOC media. Tato směs se inkubovala 1 hod při 37 °C za třepání (230 rpm). Získaná buněčná suspenze byla aplikována na misku s LB agarem obsahujícím antibiotikum zeocin o koncentraci 25 µg.ml⁻¹ a buňky se nechaly růst přes noc při 37 °C.

SOC medium: 2 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM glukosa

LB agar: 10 g.l⁻¹ trypton, 5 g.l⁻¹ kvasinkový extrakt, 5 g.l⁻¹ NaCl, 15 g.l⁻¹ agar

3.3.1.3. Preparace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerčních souprav od firmy Quiagen. Pro analýzu sekvence plasmidové DNA jednotlivých klonů byla DNA připravena pomocí mini-preparace. Pro získání dostatečného množství pro elektroporaci kvasinek *P. pastoris* byla plasmidová DNA připravena pomocí midi-preparace.

Mini - preparace plasmidové DNA:

3 ml LB media obsahujícího zeocin (LB/Z) byly zaočkovány samostatnou bakteriální kolonií z LB agarové misky a inkubovány přes noc při 37 °C za třepání. Narostlá kultura byla centrifugována 15 min při 6 000 g a 4 °C. Supernatant byl odsát a z pelety byla izolována plasmidová DNA pomocí komerční soupravy Plasmid Mini Kit od firmy Quiagen.

Midi - preparace plasmidové DNA:

4 ml LB/Z media byly zaočkovány samostatnou bakteriální kolonií z LB agarové plotny a inkubovány přibližně 5 hod při 37 °C za třepání. Narostlá kultura byla převedena do 25 ml LB/Z media a kultivována přes noc při 37 °C za třepání. Tato kultura byla centrifugována 15 min při 6 000 g a 4 °C. Supernatant byl odsát a z pelety byla plasmidová DNA izolována pomocí komerční soupravy Plasmid Midi Kit od firmy Quiagen.

LB (Luria-Bertani) medium: 1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0

LB/Z medium: LB médium, 25 µg.ml⁻¹ zeocin

3.3.1.4. Transformace kvasinek *P. pastoris*

Linearizace plasmidové DNA

Konstrukty obsahující sekvenci přirozeného IrCL1 (IrCL1-WT) a konstrukt IrCL1-T212A byly linearizovány pomocí restrikční endonukleasy *SacI* v komerčním pufru NEB I. Reakční směs obsahovala 10 µg plasmidové DNA a její složení je uvedeno v tab. 3.2. Směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Linearizovaná plasmidová DNA byla na závěr přečištěna pomocí komerční soupravy Quick Gel Extraction od firmy Quiagen a úspěšnost linearizace byla ověřena pomocí horizontální agarosové elektroforesy (kap. 3.3.4.6.).

Tab. 3.2.: Složení reakční směsi pro linearizaci plasmidové DNA.

	IrCL1-WT	IrCL1-T212A
DNA (µl)	42	84
<i>SacI</i> (µl)	2,5	5
NEB I (µl)	5	10
BSA (10 mg.ml⁻¹) (µl)	0,5	1
celkový objem (µl)	50	100

NEB I pufr: 10 mM Bis Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Příprava kvasinek *P. pastoris* na elektroporaci

Kvasinky *P. pastoris* (kmen X-33) byly z misky s YPD agarem zaočkovány do 50 ml YPD media a inkubovány přes noc při 30 °C za třepání. Z takto narostlé kultury bylo 500 µl zaočkováno do 500 ml YPD media a necháno růst do $OD_{600} = 1,3-1,5$. Poté byla kultura centrifugována 5 min při 1 500 g a 4 °C. Peleta byla resuspendována v 500 ml ledové sterilní vody a opět centrifugována 5 min při 1 500 g a 4 °C. Následně byla resuspendována v 250 ml ledové sterilní vody a centrifugována za stejných podmínek. Tato peleta byla resuspendována ve 20 ml ledového 1 M sorbitolu a opět za stejných podmínek centrifugována. Výsledná peleta byla resuspendována v 1 ml 1 M ledového sorbitolu a buňky byly do elektroporace uchovávány na ledu.

YPD (yeast, pepton, dextrose): 1 % kvasinkový extrakt, 2 % pepton, 2 % dextrosa

Transformace pomocí elektroporace

K 80 µl připravených buněk *P. pastoris* bylo přidáno 10 µg přečištěné linearizované DNA. Tato směs byla inkubována v elektroporační kyvetě po dobu 5 min na ledu. Následně byla provedena elektroporace 2 kV pulsem trvajícím 5 ms. Směs byla ihned po pulsu smíchána s 1 ml ledového 1 M sorbitolu a inkubována 2 hod při 30 °C a poté rozetřena na misku obsahující YPDS agar se zeocinem (YPDS/Z). Plotny byly inkubovány 7 dní při 30 °C. Vyrostlé kolonie byly přečárkovány na misky s YPDS/Z agarem pro získání samostatných kolonií.

YPDS/Z agar: YPD medium, 1 M sorbitol, zeocin (100 µg/ml), 2% agar.

3.3.1.5. Expres katepsinu L1 z klíštěte *I. ricinus* v *P. pastoris*

Pro expresi byly vybrány konstrukt obsahující IrCL1-WT a IrCL1-T212A.

Optimalizace exprese

Z YPDS/Z misek byly vybrány tři kolonie pro každou formu IrCL1, kterými byly zaočkovány 2 ml BMG media. Kultivace probíhala 16 hod při 30 °C za současného třepání do $OD_{600} = 2-6$. Tato kultura byla centrifugována 5 min při 1 500 g a 4 °C a peleta byla resuspendována v BMM mediu tak, aby konečná OD_{600} byla 1. V tomto mediu byla

exprese indukována přidáváním methanolu (výsledná koncentrace 0,5 %) každých 12 hod. V průběhu exprese byly v daných časových intervalech odebírány vzorky suspenze, které byly centrifugovány (5 min při 3 500 g a 4 °C) a supernatant byl použit pro měření proteolytické aktivity v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.). Exprese trvala celkem 6 dní od počáteční indukce.

Používaná média:

BMG: 0,1 M K-fosfát, pH 6,0, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % biotin, 1 % glycerol

BMM: 0,1 M K-fosfát, pH 6,0, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % biotin, 0,5 % methanol

Preparativní exprese

Kolonií produkující IrCL1-WT nebo IrCL1-T295A bylo zaočkováno 25 ml BMG media. Kultivace probíhala 16 hod při 30 °C do $OD_{600} = 2-6$. Touto kulturou bylo inokulováno 500 ml BMG media a kultivováno při 30 °C do dosažení $OD_{600} = 2-6$. Kultura byla následně centrifugována 5 min při 1 500 g a 4 °C a peleta byla resuspendována v BMM mediu tak, aby výsledná OD_{600} byla 1. Exprese probíhala 48 hod a každých 12 hod byl přidáván methanol (výsledná koncentrace 0,5 %).

Po ukončení exprese byla kultura centrifugována 5 min při 1500 g a 4 °C. Supernatant obsahující IrCL1 byl oddělen od pelety a zamražen (- 80 °C).

3.3.2. Chromatografické metody

3.3.2.1. Gelová chromatografie na koloně Sephadex G25

Media po expresi byla zahuštěna lyofilizací asi na 10 % původního objemu. Zahuštěné medium (50 ml) bylo nanášeno na kolonu Sephadex G25 (3,2 cm x 60 cm) ekvilibrovanou destilovanou vodou, která sloužila zároveň jako eluční roztok. Průtok kolonou byl $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a sbírány byly frakce o objemu 10 ml. Celý proces probíhal při teplotě 4°C. V jednotlivých frakcích byla měřena absorbance při 280 nm a vodivost. Proteolytická aktivita byla ve vybraných frakcích měřena s fluorogenním peptidovým substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.). Pro měření aktivity bylo odebíráno 20 μl dané frakce.

3.3.2.2. Iontoměničová chromatografie na koloně MonoS

Proteinová frakce získaná z expresního media pomocí gelové chromatografie (kap. 3.3.2.1.) byla pomocí lyofilizace zahuštěna asi na 10 % původního objemu. Takto získaný vzorek byl smíchán s 20 mM Na-acetátovým pufrům o pH 4,0 na celkový objem 50 ml a po přidání 2,5 mM DTT probíhala 5 min autoaktivace za laboratorní teploty. Následně byl přidán reverzibilní inhibitor cysteinových proteas S-methylmethanthiosulfonát (SMMTS; finální koncentrace 5 mM).¹⁴⁸ Navázání inhibitoru probíhalo 10 min za laboratorní teploty. Tento materiál byl separován iontoměničovou chromatografií na koloně Mono S HR 5/5 pomocí FPLC. Pro chromatografii bylo použito pH 4,0, které bylo zvoleno podle teoretické hodnoty $pI \sim 5,22$ vypočítané pro aktivní IrCL1.¹⁴² Kolona byla ekvilibrována 5 ml nanášecího pufru. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta dalšími 5 ml nanášecího pufru a eluce katepsinu L byla prováděna pomocí elučního pufru s lineárním gradientem 1 M NaCl (1 % za min). Sbírány byly 2 ml frakce, průtok byl $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Průběh separace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm. Proteolytická aktivita byla ve vybraných frakcích monitorována pomocí kinetického testu s fluorogenním peptidovým substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.). Po provedení iontoměničové chromatografie byly vzorky opět stabilizovány přidáním inhibitoru SMMTS (finální koncentrace 1 mM).

Pufry:

nanášecí: 0,2 M Na-acetát, pH 4,0

eluční: 0,2 M Na-acetát, pH 4,0; 1 M NaCl

3.3.2.3. Gelová chromatografie na koloně Superdex 75

Vzorek IrCL1-WT byl po izolaci pomocí iontoměničové chromatografie dále purifikován pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75 HR 16/30. Kolona byla ekvilibrována 240 ml 0,1 M Na-acetátového pufru pH 4,0 obsahujícího 0,2 M NaCl, který zároveň sloužil jako eluční pufr. Po nanesení na kolonu byl IrCL1-WT eluován průtokem $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Sbírány byly 2 ml frakce. Průběh separace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm. Proteolytická aktivita byla ve vybraných frakcích monitorována

pomocí kinetického testu s fluorogenním peptidovým substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.).

Získaný IrCL1-WT byl zakoncentrován pomocí koncentrátoru Millipore nepropouštějící molekuly s větší hmotností než 10 kDa na objem 250 μ l s finální koncentrací proteinu přibližně 600 μ g.ml⁻¹.

3.3.3. Precipitační metody

3.3.3.1. Acetonová precipitace proteinů

Při acetonové precipitaci byly ke vzorku přidány 4 objemy vychlazeného acetonu, čímž bylo dosaženo finální koncentrace acetonu 80 %. Roztok se nechal stát 20 min při -20°C. Následně byl roztok centrifugován (16 000 g, 10 min, 4°C) a po odsátí supernatantu byla peleta vysušena na vakuové odparce SpeedVac. Po vysušení bylo k peletě přidáno 12 μ l vzorkového pufru pro SDS PAGE a směs byla inkubována 5 min při 95°C.

3.3.4. Analytické metody

3.3.4.1. Stanovení obsahu proteinů ve vzorku

Pro stanovení obsahu proteinů ve vzorku byl použit BCA Protein Assay Kit. Tato metoda využívá schopnost proteinů redukovat ionty Cu²⁺ na Cu⁺. Redukované ionty měďné pak reagují s bicinchoninovou kyselinou za vzniku barevného komplexu s absorpčním maximem při 562 nm. Absorbance tohoto komplexu je lineárně závislá na koncentraci proteinu. Kalibrační přímka byla sestrojena pomocí standardů BSA o koncentracích 0-2 mg.ml⁻¹ rozpuštěného ve vodě. Stanovení bylo prováděno v jamkách mikrotitrační destičky přidáním 10 μ l vzorku, případně standardu k 200 μ l BCA činidla. Směs se nechala 15 min inkubovat při 37°C a byla změřena absorbance při 562 nm.

3.3.4.2. Degradace proteinových substrátů pro elektroforetickou analýzu

Reakční směs o celkovém objemu 100 μ l pro IrCL1 resp. 400 μ l pro IrCL3 obsahovala 150 nM IrCL1-WT nebo 750 nM IrCL3, substrát (lidský hemoglobin - hHb, lidský sérový albumin - HSA nebo kolagen typu I o výsledné koncentraci 100 μ g.ml⁻¹) a

0,15 M citrát-fosfátový pufr pH 4,0 pro (IrCL1) nebo 3,0 (IrCL3); 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG 1500.

V případě, že reakce probíhala v přítomnosti glykosaminoglykanů (heparin, chondroitin-6-sulfát) nebo sulfatovaného polysacharidu dextran sulfátu, byla jejich koncentrace 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Degradace hHb a HSA probíhala 1 hod při 37 °C za stálého míchání, degradace kolagenu I probíhala 7 hodin při 37 °C za stálého míchání. Reakce byla zastavena přidáním 100 % acetonu o objemu odpovídajícímu čtyřnásobku objemu reakční směsi. Následně byla provedena acetonová precipitace (kap. 3.3.3.1.) Vzorky hHb a HSA byly analyzovány pomocí SDS PAGE v 15% gelech, vzorky kolagenu v 10% gelu (kap. 3.3.4.3.).

3.3.4.3. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1 % SDS (SDS PAGE) byla provedena dle Laemmliho.¹⁴⁹ Použity byly 10 % a 15 % gely o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm, elektroforéza probíhala na přístroji Bio-Rad. Po elektroforéze byly proteiny v gelech fixovány inkubací 10 min v roztoku 50 % ethanolu a 12 % kyseliny octové. Vizualizace proteinů byla provedena pomocí roztoku Coomasie Brilliant Blue R250¹⁵⁰ nebo prostřednictvím stříbrného barvení.¹⁵⁶

Složení 6x koncentrovaného zásobního roztoku vzorkového pufru pro SDS PAGE:
100 mM Tris-Cl, pH 6,8; 30 % glycerol; 10 % SDS; 0,6 M DTT; 0,18 mM bromfenolová modř

3.3.4.4. Značení pomocí aktivitní fluorescenční značky

Pro značení IrCL1 a IrCL3 byla využita aktivitní fluorescenční značka BoRC. V případě značení IrCL1 reakční směs o celkovém objemu 50 μl obsahovala 20 μl vzorku, dále 5 μl 25 mM DTT (finální koncentrace 2,5 mM) a 1 μl 50 μM BoRC (finální koncentrace 1 μM). Směs byla na 50 μl doplněna 0,15 M citrát-fosfátovým pufrem pH 4,0. Reakce probíhala 1 hod při 37 °C. Při značení IrCL3 reakční směs o celkovém objemu 400 μl obsahovala 356 μl refoldingové směsi obsahující IrCL3 a 2,5 mM DTT. Směs byla na 400 μl doplněna 1 M Na-acetátovým pufrem pH 4,0. V této směsi probíhala aktivace 90 min při 37 °C. Následně byla přidána aktivitní fluorescenční značka BoRC na finální

koncentraci 1 μM . Tato směs byla inkubována 1 hod při 37 °C. Veškeré inkubace probíhaly ve tmě.

Po inkubaci s fluorescenční aktivitní značkou BoRC byla provedena acetonová precipitace proteinů (kap. 3.3.3.1.). Po precipitaci bylo přidáno 12 μl vzorkového pufru pro SDS PAGE a vzorky byly nanесeny na SDS PAGE. Po ukončení elektroforézy a promytí gelu 3x 10 min v destilované vodě byl gel analyzován na fluorescenčním skeneru Typhoon při excitační vlnové délce 532 nm a s emisním filtrem propouštějícím záření o vlnové délce 550 nm.

3.3.4.5. Degradace proteinových substrátů pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie

Jako substrát byl použit lidský sérový albumin (HSA) a lidský hemoglobin (hHb). Inkubováno bylo 0,3 mg substrátu v reakční směsi o celkovém objemu 100 μl , která dále obsahovala 441 nM IrCL1-WT, 2,5 mM DTT. Reakce probíhala v 0,15 M citrát-fosfátovém pufru pH 4,0 při 37 °C po dobu 30 a 180 min. Následně bylo přidáno 100 μl 1 % trifluoroctové kyseliny (TFA) a vzorek byl centrifugován 10 min při 13 000 g a 4 °C. Vzniklé fragmenty byly analyzovány pomocí systému HPLC s reverzní fází (HPLC Agilent 1200 Series), používána byla kolona C18 ekvilibrovaná 0,1 % TFA. Eluce probíhala lineárním gradientem acetonitrilu obsahujícím 0,1 % TFA (1 % za min). Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 220 nm. Jednotlivé absorpční vrcholy byly manuálně sbírány. Obsah jednotlivých absorpčních vrcholů byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací (FT/MS) za použití LTQ Orbitrap XL hmotnostního spektrometru (Thermo). Měření na hmotnostním spektrometru a vyhodnocení dat provedla Mgr. Zuzana Demianová, PhD (servisní pracoviště ÚOCHB AV ČR).

3.3.4.6. Horizontální agarosová elektroforéza

Velikost fragmentů DNA byla analyzována horizontální agarosovou elektroforézou. Agarosa byla rozpuštěna zahřátím v TAE pufru na výslednou koncentraci 1%. Po ochlazení na 60 °C byl přidán Gel Red, aby výsledná koncentrace byla 0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Směs se nechala tuhnout v elektroforetické vaně s vloženým hřebenem. Do jamek vzniklých vyjmutím hřebenu se nanášel DNA standard a vzorky smíchané se vzorkovým pufrem. Elektroforetické dělení probíhalo při 120 V po dobu 15-30 min. Fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV lampou při vlnové délce 302 nm (příp. 365 nm).

Vzorkový pufr: 6x Orange Loading Dye Solution (Fermentas)

TAE pufr: 40 mM Tris-acetát, pH 8,0; 2 mM EDTA

Molekulové standardy: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

3.3.4.7. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla určena měřením absorbance při 260 nm na přístroji NANODROP 2000 (Thermo Scientific). Kontaminace DNA proteiny byla určena z podílu A_{260}/A_{280} . Rozmezí 1,8-2,0 udává přijatelnou čistotu DNA.¹⁵¹

3.3.4.8. Určení sekvence DNA

Sekvenace DNA byla provedena laboratoří sekvenace DNA PřF UK. Pro sekvenační analýzu byly využity komerční primery (Invitrogen) α -faktor sekvenační primer a 3' AOX sekvenační primer odvozené z plasmidu pPICZ α .¹⁴⁷ Sekvence byly analyzovány pomocí programu DNASTAR.

3.3.5. Analýza enzymové aktivity

Aktivita různých forem katepsinu L byla stanovena měřením fluorescence vzniklé štěpením fluorogenních peptidových substrátů s fluorescenční značkou AMC. Měření byla prováděna při 37°C v mikrotitračních destičkách pomocí fluorescenční čtečky GENios. Fluorescence produktu byla měřena při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm.

3.3.5.1. Kinetický test s fluorogenním substrátem

Celkový objem reakční směsi pipetovaný do mikrotitrační destičky byl 100 μ l a směs obsahovala: enzym (koncentrace je uvedena níže); 0,15 M citrát-fosfátový pufr pH 3,0 (pro stanovení aktivity IrCL3); pH 4,0 (IrCL1-WT a IrCL1-T212A) nebo pH 5,0 (hCL); 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG 1500 a 25 μ M Z-FR-AMC. Při měření aktivity v přítomnosti heparinu směs navíc obsahovala heparin o koncentraci 25 μ g. ml^{-1} nebo 100 μ g. ml^{-1} . Aktivita byla měřena jako rychlost štěpení fluorogenního substrátu enzymem. Při měření aktivity IrCL1-WT a IrCL1-T212A byla směs před přidáním substrátu 3 min inkubována pro zrušení vazby reverzibilního inhibitoru SMMTS. Při měření aktivity IrCL3 byl před měřením aktivity proenzym aktivován 90 min při pH 4,0 a 37 °C.

Koncentrace enzymů v dané reakční směsi:

IrCL1-WT - 4,4 nM

IrCL1-T212A - 123 nM

IrCL3 - 218 nM

hCL - přidáváno 10 μ l 2000x ředěného komerčního preparátu

3.3.5.2. Stanovení pH optima

Pro stanovení závislosti enzymové aktivity na pH bylo provedeno podle postupu uvedeného v kap. 3.3.5.1. v 0,15 M citrát-fosfátovém pufru pH 2,2-8,0.

3.3.5.3. Určení substrátové specifity

Substrátová specifita byla určována podle postupu uvedeného v kap. 3.3.5.1. Použity byly tyto substráty (výsledná koncentrace 25 μ M, 125 μ M zásobní roztoky): Z-FR-AMC, Bz-FVR-AMC, Boc-VLK-AMC, Suc-LT-AMC, Z-RR-AMC, Boc-QAR-AMC, Suc-LLVY-AMC, Suc-AAF-AMC, Suc-AAPF-AMC

3.3.5.4. Titrace aktivního místa katepsinu L

Koncentrace aktivních forem IrCL1-WT, IrCL1-T212A a IrCL3 byla stanovena titrací inhibitorem kovalentně se vážajícím do aktivního místa enzymu v poměru 1:1. Použit byl ireverzibilní inhibitor cysteinových proteas E-64.¹⁵⁷

Inhibice byla měřena se substrátem Z-FR-AMC v reakční směsi o stejném složení jako v kap. 3.3.5.1. Navíc byl přidáván inhibitor E-64 v koncentračním rozsahu 0,1 nM - 10 μ M ke konstantnímu množství enzymu. Po přidání E-64 byla směs před přidáním substrátu 15 min inkubována při 37 °C pro navázání inhibitoru. Relativní aktivity pro jednotlivé koncentrace E-64 vztažené na 100 % aktivity neinhibovaného enzymu byly zpracovány v programu GraFit vynesemím v_i/v_0 (relativní aktivita vztažená na 100% aktivity neinhibované reakce, osa y) vs. [I] (koncentrace inhibitoru, osa x). Získaná hodnota IC₅₀ odpovídala poloviční koncentraci aktivní formy enzymu. Přesná koncentrace zásobních roztoků inhibitoru E-64 byla stanovena aminokyselinovou analýzou.

3.3.5.5. Měření kinetických konstant

Michaelisova konstanta K_m a katalytická konstanta k_{kat} byly stanoveny měřením počáteční rychlosti v_0 enzymové reakce s IrCL1-WT a IrCL1-T212A při různých koncentracích substrátu Z-FR-AMC v reakční směsi o složení uvedeném v kap. 3.3.5.1. Koncentrace substrátu $[S]$ byla v rozmezí 0-200 μM . Koncentrace zásobních roztoků substrátu byly ověřeny pomocí aminokyselinové analýzy provedené na servisním pracovišti ÚOCHB AV ČR. Hodnoty K_m a V_{max} byly získány pomocí programu GraFit, kde byla vynesena počáteční rychlost reakce v_0 vs. $[S]$. Katalytická konstanta k_{kat} byla získána ze vztahu:

$$k_{kat} = \frac{V_{max}}{[E_0]},$$

kde $[E_0]$ je celková koncentrace enzymu.

Katalytická účinnost enzymů byla vyjádřena poměrem konstant $\frac{k_{kat}}{K_m}$.

3.3.6. Refolding katepsinu L3 z klíštěte *I. ricinus*

Rekombinantní katepsin L3 z klíštěte *I. ricinus* (IrCL3) byl produkován v expresním systému *E. coli* jako proenzym s histidinovou kotvou na N-konci peptidového řetězce. Inkluzní tělíska byla následně izolována pomocí afinitní chromatografie na koloně Ni-NTA Sepharosa, která koordinační vazbou váže histidinovou kotvu. Tento preparát poskytl Dr. Petr Kopáček.

Protokol pro refolding byl upraven podle postupu uvedeném ve ¹⁵³. Zahrnoval dva kroky:

1) Redukce thiolových skupin proteinu:

Roztok denaturovaného proenzymu (600 μg) purifikovaný afinitní chromatografií na koloně Ni-NTA Sepharosa byl přidán do 100 μl preinkubačního roztoku obsahujícího 50 mM GSH. ¹⁵³ Roztok se inkuboval 1 hod při 37°C za míchání.

2/ Refolding proteinu:

Zredukováná směs byla při pokojové teplotě přikapávána za stálého míchání do 900 μl refoldingové směsi, jejíž složení bylo 50 mM Tris pH 8; 30 % glycerol; 0,05 % PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Finální směs byla inkubována 7 dní při 4 °C za stálého míchání.

V refoldingové směsi byla každý den měřena proteolytická aktivita v kinetickém testu s peptidovým fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.). Do testu bylo používáno 20 μ l refoldingové směsi

4. Výsledky

4.1. Katepsin L1 z klíštěte obecného

4.1.1. Mutageneze glykosylačních sekvencí IrCL1

Aminokyselinová sekvence katepsinu L1 klíštěte *I. ricinus* (IrCL1) obsahuje dvě sekvence pro potenciální N-glykosylaci (Asn-X-Ser/Thr) - v pozici 212 a v pozici 295 (obr. 4.1.). Pro usnadnění plánované krystalizace IrCL1 byla tato glykosylační místa modifikována místně specifickou mutagenezí - zbytek threoninu přítomný v glykosylačním signálu byl mutován na zbytek alaninu.

```
1 - AGTGCCTCGGGAGTCCGGTCCGAGTCTTTTGTGGAGTGTTTACCAATCGTGCAAGGTCA - 60
-                                     M
61 - TGCTGCGGTGCCTCGTGTGTGTCTCTCGTTGCTGCCGCAGCTGCGGTACAGTACCAGG - 120
-   L R C L V L C L L V A A A A A V S Y Q E
121 - AAGTTCTTGGCGCTGAATGGTCCGGCTTTCAAGGCAAAGCATGGGAAGTCTTATGTGTCTG - 180
-   V L G A E W S A F K A K H G K S Y V S E
181 - AAACCTGAGGAGGTGTTTCAGGCTGAAGATCTACATGGAGAACAGGCACAAGATTGCCAAGC - 240
-   T E E V F R L K I Y M E N R H K I A K H
241 - ACAACGAGAAGTATGCCAGGGGGAGGTGCCCTACAGCATGGCCATGAACGAGTTTGGAG - 300
-   N E K Y A R G E V P Y S M A M N E F G D
301 - ACATGCTTCACCACGAATTCGTGAGCACCCGCAATGGCTTCAAGCGAAACTACAAGGATC - 360
-   M L H H E F V S T R N G F K R N Y K D Q
361 - AGCCAGGGAGGGATCTACATACCTGGAGCCAGAAAACATTGAGGACTTCAGCCTGCCCA - 420
-   P R E G S T Y L E P E N I E D F S L P K
421 - AGACCGTGGACTGGAGGACCAAGGGCGCGGTACGCCCCTCAAGAACCAGGACAGTGTG - 480
-   T V D W R T K G A V T P V K N Q G Q C G
481 - GATCCTGTGGGCTTTCAGTGTCTACCGGATCCCTGGAAGGACAGCACTTCCGCAAGAGTG - 540
-   S C W A F S A T G S L E G Q H F R K S G
541 - GCTCCATGGTCTCCCTGAGCGAACAGAACCTGGTCCGCTGTCTCCACTGACTTTGGAACA - 600
-   S M V S L S E Q N L V G C S T D F G N N
601 - ACGGTTGTGAGGGTCTCATGACGATGCCTTCAAATACATCAGGGCCACCAAGGCA - 660
-   G C E G G L M D D A F K Y I R A N K G I
661 - TTGACACCGAAAAGAGCTACCCCTACAATGGCAGGACGGCACTTGCCACTTCAAGAAGA - 720
-   D T E K S Y P Y N G T D G T C H F K K S
721 - GCACCGTTGGGGCCACGACGCGCTTTGTGGACATCAAGGAAGGCTCGGAGACGCAGC - 780
-   T V G A T D S G F V D I K E G S E T Q L
781 - TGAAGAAGGCGGTGGCCACCGTTGGACCCATCTCTGTTGCCATTGATGCCACGCCAGAGT - 840
-   K K A V A T V G P I S V A I D A S H E S
841 - CTTTCAGTTCTACTCTGACGCTGTGTACGACGAGCAGAGTGTGACAGCAGTCCCTGG - 900
-   F Q F Y S D G V Y D E P E C D S E S L D
901 - ACCACGGTGTCTTGTGGTTGTTTACGGCACCCCTCAACGGCACTGACTACTGGTTCGTCA - 960
-   H G V L V V G Y G T L N G T D Y W F V K
961 - AGAACAGTTGGGAACACCTGGGGTGATGAAGGCTACATCCGCATGAGCAGGAACAAGA - 1020
-   N S W G T T W G D E G Y I R M S R N K K
1021 - AGAACAGTGTGAATCGCTTCCAGTGTAGCATACCTCTTGTGTAA - 1080
-   N Q C G I A S S A S I P L V *
```

Obr. 4.1.: **Sekvence IrCL1:** Uvedena je nukleotidová sekvence cDNA (horní řádek) a příslušná aminokyselinová sekvence (spodní řádek). N-glykosylační signál je vyznačen šedě, mutované aminokyseliny červeně, tučně a kurzívou je znázorněna odpovídající sekvence syntetických oligonukleotidů s červeně vyznačenou mutovanou bazí. Podtržena je aminokyselinová sekvence signálního peptidu, tučně je aminokyselinová sekvence propeptidu, hvězdičkou je označen stop kodon.

Mutageneze probíhala pomocí metody PCR za využití syntetických oligonukleotidů obsahujících požadovanou bodovou mutaci (kap. 3.3.1.1.) a vektoru

pPICZ α B. Po provedení mutagenese tak byly k dispozici celkem čtyři různé konstrukty IrCL1 lišící se počtem signálů pro potenciální N-glykosylaci (tab. 4.1.).

Tab. 4.1.: **Připravené konstrukty IrCL1.**

Označení	Mutace	Teoretický počet N-glykanů
IrCL1-WT	žádná	2
IrCL1-T212A	T212→A	1
IrCL1-T295A	T295→A	1
IrCL1-DM	T212→A, T295→A	0

Po provedení mutagenese byly plasmidy transformovány buňky *E. coli*, které byly použity pro přípravu většího množství DNA. Mutace byly ověřeny pomocí sekvenace DNA

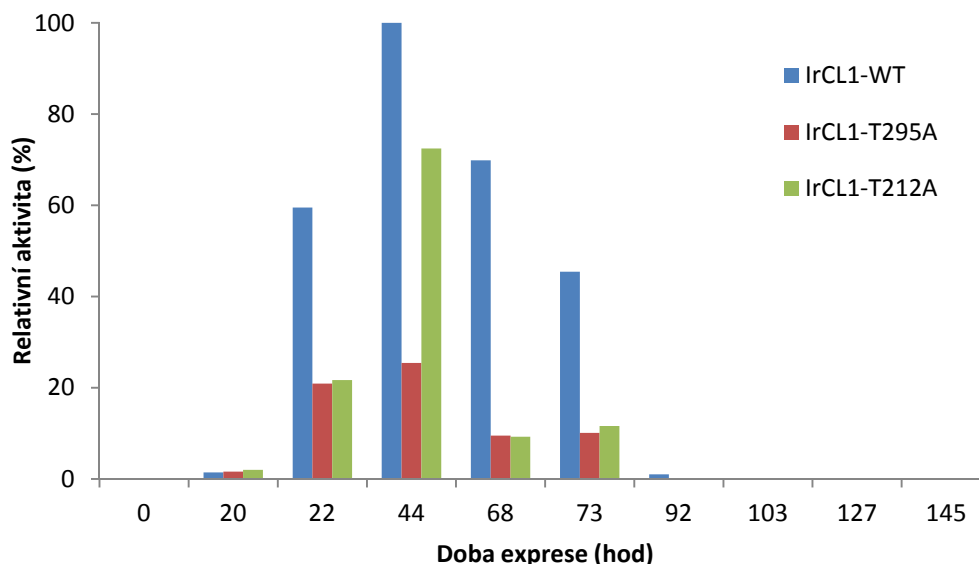
4.1.2. Exprese IrCL1 v kvasinkách *P. pastoris*

Plasmidy obsahující IrCL1-T212A, IrCL1-T295A a IrCL1-WT byly linearizovány pomocí *SacI* restriční endonukleasy. Linearizované plasmidy byly metodou elektroporace přeneseny do buněk *P. pastoris* (kap. 3.3.1.4.). Transformované buňky *P. pastoris* byly rozetřeny na misky obsahující YPD medium a antibiotikum zeocin, proti kterému nese plasmid pPICZ α resistenci, a kultivovaly se po dobu 5 dní v 30 °C.

Koloniemi narostlými na miskách bylo následně zaočkováno BMG medium a kultivace probíhala 30 hod při 30 °C. Poté byly buňky převedeny do BMM media. V tomto mediu byla exprese rekombinantního proteinu indukována přidáním methanolu. Methanol způsobuje indukci exprese prostřednictvím promotoru genu *Aox1*, který je obsažený v plasmidu pPICZ α . Gen *Aox1* (kódující enzym alkoholoxidasu) je pro *P. pastoris* významný, neboť se jedná o methylotrofní organismus využívající alkoholoxidasu v anabolických drahách a promotor tohoto genu tak v přítomnosti methanolu způsobuje velice efektivní transkripci. Indukce exprese prostřednictvím methanolu byla prováděna každých 12 hod. Enzym byl produkován do expresního media. V daných časových intervalech byly odebírány alikvoty expresního media, které následně sloužily ke stanovení aktivity IrCL1 v mediu v závislosti na čase (obr. 4.2., str. 71).

Proteolytická aktivita byla stanovena pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Tato analýza ukázala, že maximální akumulace aktivity IrCL1 bylo v expresním mediu dosaženo u všech forem po 44 hodinách od počáteční indukce

exprese. Nejvyšší aktivitu měla forma IrCL1-WT, velmi nízkou aktivitu vykazovala forma IrCL1-T295A. Pro preparativní expresi byly vybrány formy IrCL1-WT a IrCL1-T212A, s formou IrCL1-T295A se dále nepracovalo.



Obr. 4.2.: Časový průběh exprese IrCL1 v *P. pastoris*. V průběhu exprese byly ve vyznačených časových intervalech odebírány alikvoty expresního media, ve kterém byla následně měřena proteolytická aktivita IrCL1-WT (modrá), IrCL1-T295A (červená) a IrCL1-T212A (zelená) v kinetickém testu se substrátem Z-FR-AMC. Na ose x je vynesena doba od počátku indukce exprese, na ose y je vynesena relativní aktivita v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty.

4.1.3. Izolace rekombinantních forem katepsinu L1

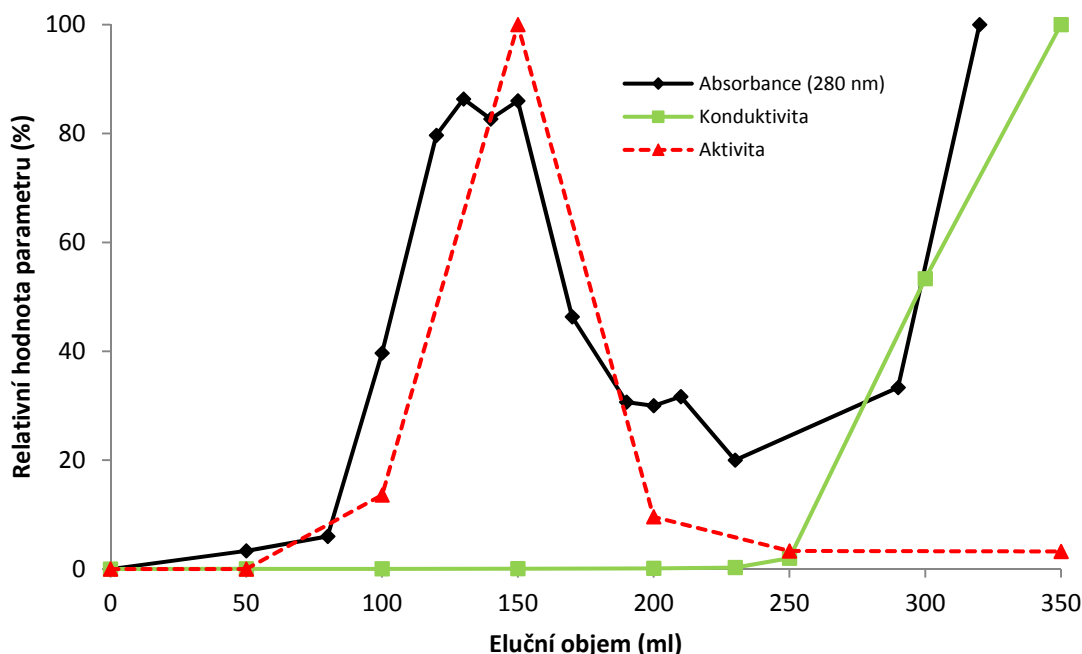
Materiál pro izolaci IrCL1-WT a IrCL1-T212A byl připraven rekombinantní expesí v *P. pastoris* v 1000 mL media, exprese byla ukončena 44 hodin od počátku indukce methanolem. Navržena byla procedura zahrnující kombinaci gelových chromatografií a ionexové chromatografie.

4.1.3.1. Izolace IrCL1-WT

Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie

Expresní medium bylo po odstranění buněk zahuštěno lyofilizací a rozděleno gelovou chromatografií na koloně Sephadex G25 ekvilibrované destilovanou vodou.

Výsledkem gelové chromatografie bylo oddělení proteinové frakce, která vykazovala proteolytickou aktivitu (obr. 4.3.). Tato frakce byla dále purifikována iontoměničovou chromatografií.

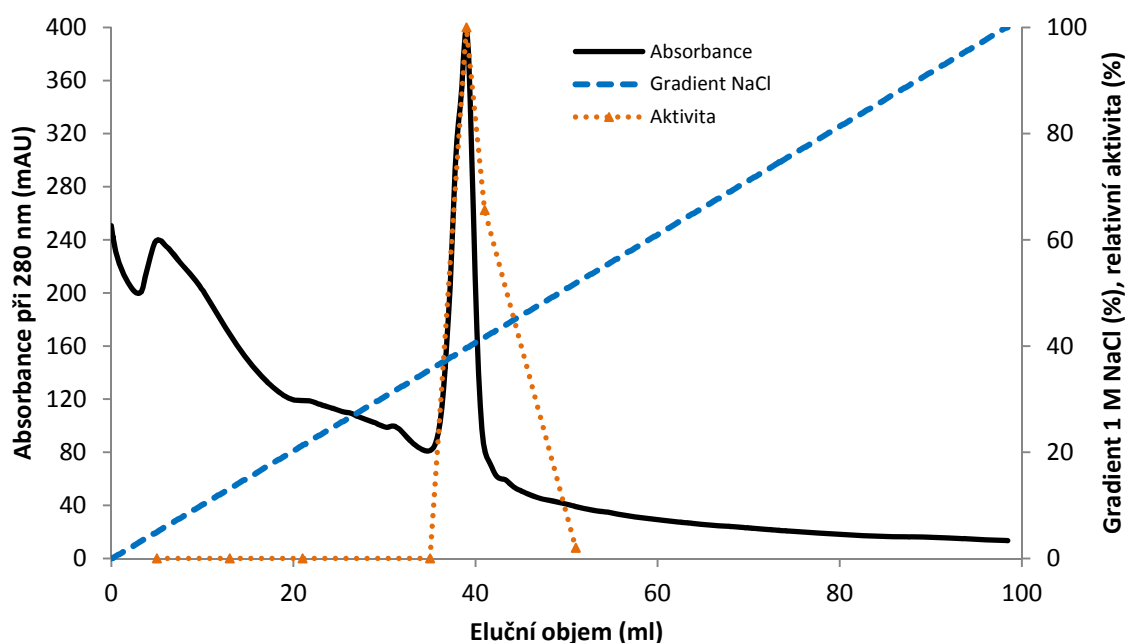


Obr. 4.3.: **Purifikace IrCL1-T212A pomocí gelové chromatografie.** Purifikace probíhala na koloně Sephadex G25 (3,2 cm x 60 cm) ekvilibrované v destilované vodě. Průběh izolace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (černá křivka), konduktivity (zelená křivka) a stanovena byla proteolytická aktivita v kinetickém testu se substrátem Z-FR-AMC (červená křivka). Na ose x je vyneseno eluční objem. Měřené parametry jsou normalizovány na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie

Proteinová frakce po gelové chromatografii (viz. výše) byla zahuštěna lyofilizací. IrCL1-WT byl stabilizován před možnou autodegradací pomocí kovalentního reverzibilního inhibitoru cysteinových proteas S-methylmethanthiosulfonátu, který se váže na katalytický cystein a jeho vazba může být zrušena v přítomnosti redukčního činidla. IrCL1-WT byl poté purifikován pomocí iontoměničové chromatografie na koloně MonoS HR 5/5 na FPLC přístroji AKTA Purifier. Pro vazbu IrCL1-WT na nosič bylo použito pH 4,0, které bylo zvoleno podle teoretické hodnoty pI 5,22 vypočítané z aminokyselinové sekvence IrCL1.

Eluce z kolony probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v pufru o pH 4,0. Přítomnost proteinů byla monitorována měřením absorbance při 280 nm. Aktivní IrCL1-WT ve frakcích byl detekován pomocí aktivního testu se substrátem Z-FR-AMC. Aktivita byla nalezena pouze v hlavním absorpčním vrcholu (obr. 4.4.).



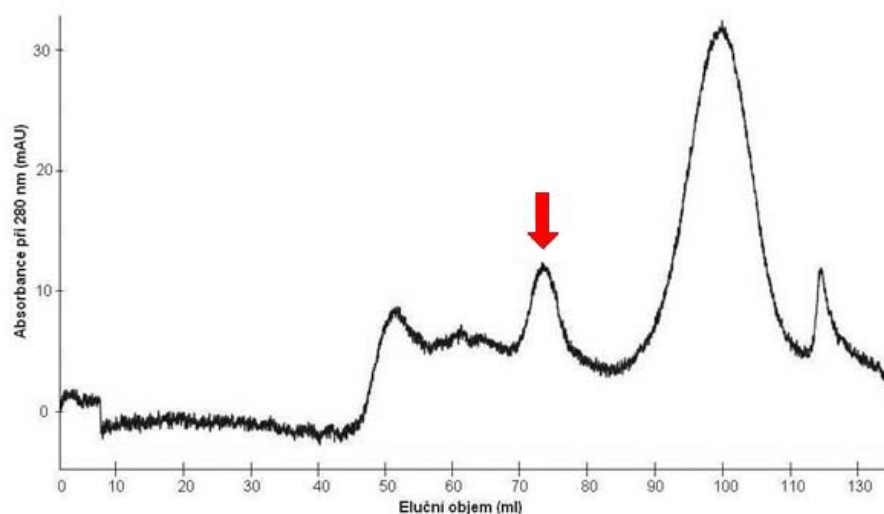
Obr. 4.4.: **Izolace IrCL1-WT pomocí iontoměničové chromatografie na koloně MonoS HR 5/5.** Na kolonu ekvilibrovanou Na-acetátovým pufrům pH 4,0 byla nanesena zakonzentrovaná proteinová frakce po gelové chromatografii. Proteiny byly eluovány lineárním gradientem 0-1 M NaCl v Na-acetátovém pufru pH 4 (modrá křivka, vedlejší osa y). Sbírány byly frakce o objemu 2 ml. Průběh izolace byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při 280 nm (černá křivka, hlavní osa y), ve vybraných frakcích byla měřena aktivita IrCL1-WT v aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC (oranžová). Na ose x je vyneseno eluční objem v ml Aktivita je normalizována na 100% nejvyšší naměřené hodnoty a je vynesena na vedlejší osu y.

Purifikace pomocí gelové chromatografie

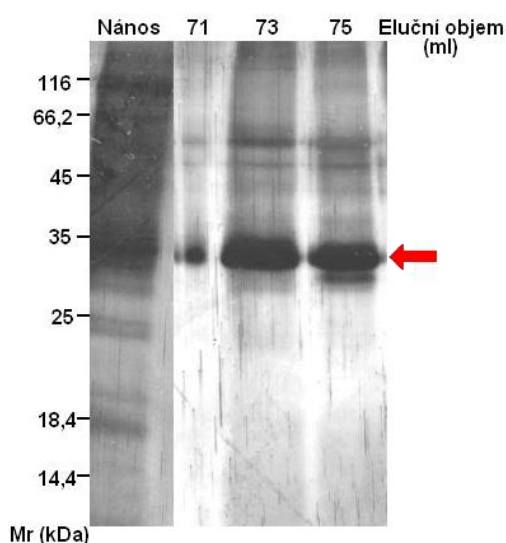
Preparát IrCL1-WT byl po chromatografii na koloně MonoS dále purifikován pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75 HR 16/30 ekvilibrované Na-acetátovým pufrům pH 4,0 obsahujícím 0,2 M NaCl. Průběh purifikace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (obr. 4.5., str. 74). Aktivita IrCL1-WT byla identifikována pouze v absorpčním vrcholu označeném červenou šipkou v obr. 4.5.A. Frakce tvořící tento vrchol byly spojeny a pomocí koncentrátoru Amicon Ultra

(nepropouštějící molekuly s větší molekulovou hmotností než 10 kDa) zakonzentrovány na koncentraci přibližně $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tento preparát byl použit pro další experimenty.

A



B



Obr. 4.5.: Purifikace IrCL1-WT pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75 HR 16/30.

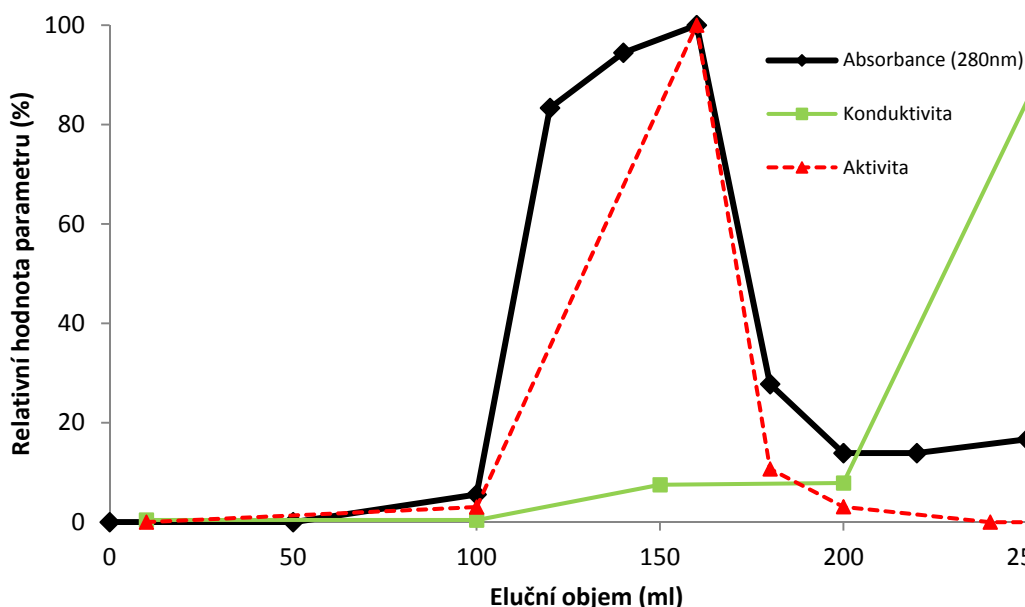
A) Na kolonu ekvilibrovanou Na-acetátovým pufrům pH 4,0 obsahujícím 0,2 M NaCl byly naneseny spojené frakce po iontoměničové chromatografii na koloně MonoS obsahující IrCL1-WT. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (osa y). Na ose x je vynesena eluční objem v ml. Proteolytická aktivita IrCL1-WT stanovená v aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC byla detekována v absorpčním vrcholu označeném červenou šipkou v oblasti elučního objemu 69-75 ml.

B) SDS PAGE analýza vzorku nanášeného na kolonu a tři frakce s vyznačeným elučním objemem v ml, které obsahovaly proteolytickou aktivitu. Pozice IrCL1-WT je označena červenou šipkou. Proteiny jsou barveny stříbrem.

4.1.3.2. Izolace IrCL1-T212A

Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie

Purifikace IrCL1-T212A probíhala podle procedury vyvinuté pro izolaci IrCL1-WT. Medium po expresi bylo po odstranění buněk *P. pastoris* zahuštěno lyofilizací a děleno gelovou chromatografií na koloně Sephadex G25 ekvilibrované v destilované vodě. Chromatografie IrCL1-T212A měla průběh analogický průběhu izolace IrCL1-WT (kap. 4.1.3.1.). Výsledkem bylo oddělení proteinové složky (obr. 4.6.), která byla dále purifikována iontoměničovou chromatografií.



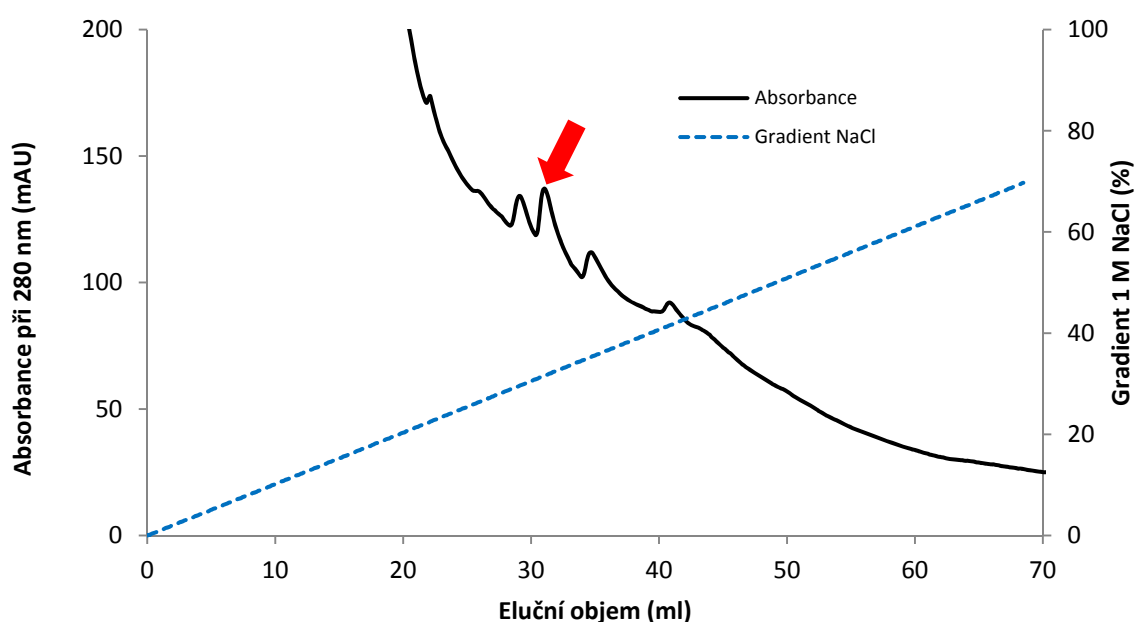
Obr. 4.6.: **Purifikace IrCL1-T212A pomocí gelové chromatografie.** Purifikace probíhala na koloně Sephadex G25 (3,2 cm x 60 cm) ekvilibrované v destilované vodě. Průběh izolace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (černá křivka), konduktivity (zelená křivka) a stanovením proteolytické aktivity v aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC (červená křivka). Na ose x je vynesena eluční objem v ml. Měřené parametry jsou normalizovány na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie

Materiál IrCL1-T212A byl po gelové chromatografii zahuštěn lyofilizací. IrCL1-T212A byl stabilizován pomocí kovalentního reverzibilního inhibitoru cysteinových

proteas S-methylmethanthiosulfonátu a purifikován na koloně MonoS HR 5/5 pomocí systému FPLC. Eluce z kolony probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v Na-acetátovém pufru pH 4,0. Přítomnost proteinů byla monitorována měřením absorbance při 280 nm, aktivita IrCL1-T212A byla měřena v aktivitním testu se substrátem Z-FR-AMC (obr. 4.7.). Aktivita IrCL1-T212A byla nalezena ve frakci o elučním objemu 31 ml (červená šipka v obr. 4.7.).

Takto získaný preparát IrCL1-T212A byl použit pro další měření.



Obr. 4.7.: **Purifikace IrCL1-T212A pomocí iontoměničové chromatografie na koloně MonoS HR 5/5.** Na kolonu ekvilibrovanou Na-acetátovým pufrům pH 4,0 byla nanášena zakonzentrovaná proteinová frakce po gelové chromatografii. Proteiny byly eluovány lineárním gradientem 0-1 M NaCl (modrá křivka, vedlejší osa y) v Na-Acetátovém pufru pH 4,0. Průběh izolace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (černá křivka, hlavní osa y). Aktivita IrCL1-T212A měřená pomocí aktivitního testu se substrátem Z-FR-AMC byla nalezena v absorbním vrcholu označeném červenou šipkou. Na ose x je vyneseno eluční objem v ml.

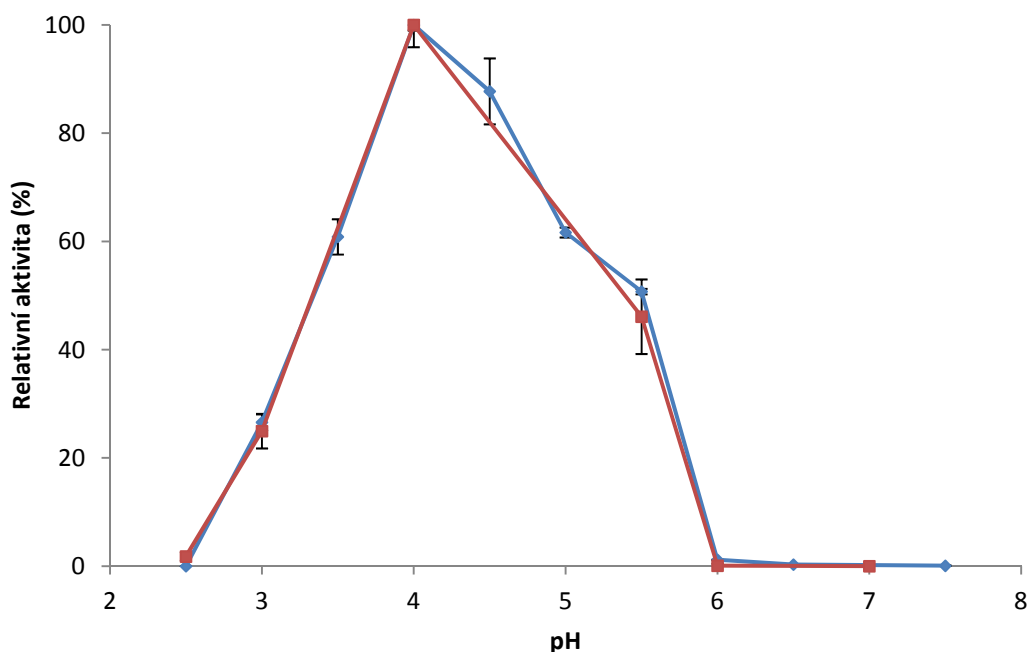
4.1.4. Biochemické vlastnosti katepsinu L1

4.1.4.1. Porovnání vlastností IrCL1-WT a IrCL1-T212A

Určení pH optima enzymové aktivity

IrCL1-WT má pH optimum v kyselé oblasti kolem pH 4.^{141,159} Pro zjištění vlivu mutace T212A na aktivitu IrCL1 bylo určeno pH optimum proteolytické aktivity

IrCL1-WT a IrCL1-T212A s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Mutantní forma IrCL1-T212A postrádající jeden z N-vázaných oligosacharidů vykazuje téměř identickou závislost proteolytické aktivity na pH jako IrCL1-WT (obsahující potenciálně dva N-vázané oligosacharidy), s pH optimem v oblasti kolem pH 4,0 (obr. 4.8.)



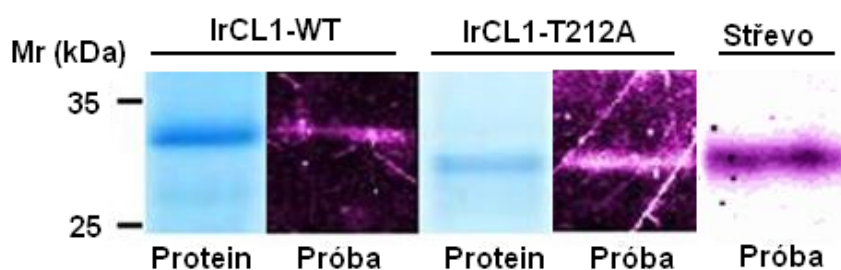
Obr. 4.8.: Závislosti proteolytické aktivity IrCL1-WT (modrá křivka) a IrCL1-T212A (červená křivka) na pH. Pro stanovení byl použit fluorogenní substrát Z-FR-AMC. Aktivity jsou normalizovány na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

Analýza pomocí SDS PAGE a fluorescenčního značení

Aktivní IrCL1-WT a IrCL1-T212A byly po purifikaci analyzovány na SDS PAGE (obr. 4.9., str. 78). IrCL1-WT migroval na elektroforéze jako pás o molekulové hmotnosti přibližně 33 kDa, naproti tomu IrCL1-T212A tvořil pás o molekulové hmotnosti přibližně o 3 kDa nižší. Teoretická molekulová hmotnost aktivní formy IrCL1 (s odštěpeným propeptidem) byla vypočtena z aminokyselinové sekvence. Pozorovanou vyšší molekulovou hmotnost IrCL1-WT 33 kDa oproti teoretické hodnotě 24 kDa lze vysvětlit přítomností N- vázaných oligosacharidů na molekule rekombinantního proteinu. Stejně tak pokles molekulové hmotnosti IrCL1-T212A na 30 kDa je zřejmě způsoben absencí N-vázaných oligosacharidů v pozici 212 u IrCL1-T212A, který má pouze jeden N-glykosylační sekvenční signál oproti IrCL1-WT se dvěma N-glykosylačními signály.

Tento výsledek také naznačuje, že obě predikovaná N-glykosylační místa IrCL1-WT jsou využita pro vazbu N-vázaných oligosacharidů.

Obě formy IrCL1 byly dále analyzovány pomocí fluorescenčního aktivního značení. IrCL1 byl před analýzou na SDS PAGE inkubován s fluorescenční reaktivní značkou BoRC. Tato značka je specifickým ireversibilním inhibitorem proteas papainového a trypsinového typu. Její struktura je tvořena peptidovým inhibitorem o sekvenci Phe-Pro-Arg, který se váže do aktivního místa, a reaktivní chloromethylketonovou skupinou kovalentně reagující s katalytickým cysteinem. Fluorescenční vlastnosti značky jsou zajišťovány přítomností fluorescenční skupiny Bodipy 530/550. Použitím fluorescenčního skeneru byly vizualizovány pásy obou forem IrCL1, které byly porovnány s pásem autentického IrCL1 vizualizovaného pomocí BoRC v homogenátu střevní tkáně klíštěte *I. ricinus* (obr. 4.9.). Molekulová hmotnost tohoto autentického enzymu odpovídá 30 kDa, což je pravděpodobně projevem menší velikosti N-vázaných oligosacharidů na autentické formě IrCL1 oproti N-glykanům na rekombinantní formě IrCL1-WT produkované v kvasinkách *P. pastoris*. Kvasinky *P. pastoris* jsou známé hyperglykosylací heterologně exprimovaných proteinů, protože mají mírně odlišný glykosylační systém oproti vyšším eukaryotům.¹⁴³



Obr. 4.9.: **Analýza IrCL1 na SDS PAGE.** Gely byly barveny Coomasie Brilliant Blue R250 (protein) nebo byly enzymy vizualizovány aktivní fluorescenční značkou BoRC, která se kovalentně váže do aktivního místa (próba). Rekombinantní IrCL1-WT a IrCL1-T212A byly porovnávány s autentickým IrCL1 v homogenátu střevní tkáně klíštěte *I. ricinus*.

Určení aktivních kinetických konstant

Základní kinetické konstanty - Michaelisova konstanta (K_m), číslo přeměny (k_{kat}) a katalytická účinnost (k_{kat}/K_m) - byly stanoveny pro reakci IrCL1-WT a IrCL1-T212A se substrátem Z-FR-AMC (tab. 4.2.). Hodnoty K_m jsou pro IrCL1-WT a IrCL1-T212A podobné, to ukazuje, že vazba substrátu nebyla po zavedení mutace a odstranění jednoho

ze dvou N-glykanů výrazně ovlivněna. Naproti tomu rozdíl byl nalezen u čísla přeměny k_{kat} , které je pro IrCL1-T212A 37 krát nižší než pro IrCL1-WT. Důsledkem nižšího čísla přeměny mutantní formy je u IrCL1-T212A přibližně 50 krát nižší i katalytická účinnost k_{kat}/K_m .

Tab. 4.2.: Porovnání aktivitních kinetických konstant IrCL1-WT a IrCL-T212A pro substrát Z-FR-AMC.

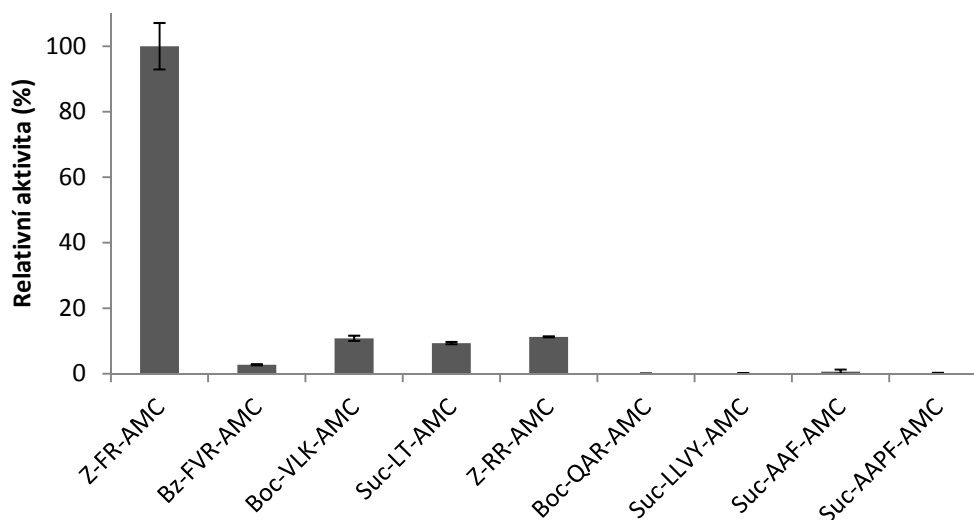
Enzym	K_m (μM)	k_{kat} (s ⁻¹)	k_{kat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
IrCL1-WT	11,6	0,17	14 655
IrCL1-T212A	14,4	4,6·10 ⁻³	319

4.1.4.2. Substrátová specifita IrCL1-WT

Substrátová specifita IrCL1-WT byla analyzována pomocí několika přístupů za využití vybraných nízkomolekulárních fluorogenních substrátů a přirozených, fyziologicky významných proteinových substrátů.

Nízkomolekulární syntetické substráty

Substrátová specifita IrCL1-WT byla nejprve testována se sadou syntetických peptidových fluorogenních substrátů (obr. 4.10., str. 80). Analýza ukázala, že nejvyšší aktivitu vykazoval IrCL1-WT se substrátem Z-FR-AMC, který je standardně používán pro stanovení aktivity katepsinů L a B. Dále byly štěpeny substráty s bazickým nebo polárním aminokyselinovým zbytkem v pozici P1: Z-RR-AMC, Boc-VLK-AMC, Bz-FVR-AMC a Suc-LT-AMC, ačkoliv substrát Boc-QAR-AMC štěpen nebyl. Substráty s hydrofobním aminokyselinovým zbytkem v pozici P1 Suc-LLVY-AMC, Suc-AAF-AMC a Suc-AAPF-AMC a Boc-QAR-AMC nebyly štěpeny.

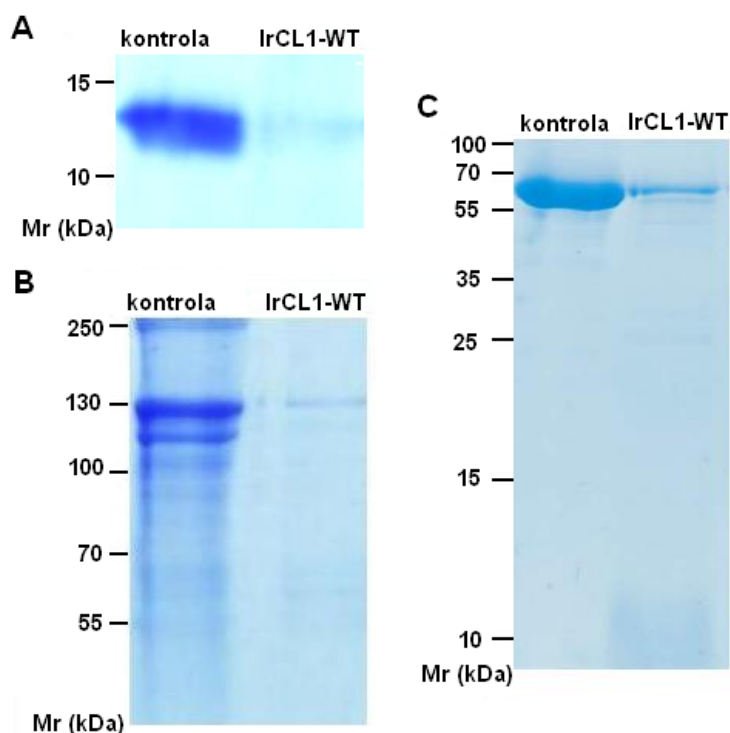


Obr. 4.10.: **Určení substrátové specifity IrCL1-WT.** Aktivita IrCL1-WT byla měřena v kinetickém aktivním testu s uvedenými substráty při pH 4,0 (osa x). Stanovení aktivity je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

Degradace proteinových substrátů

Potenciál IrCL1-WT degradovat proteinové substráty byl testován s lidským sérovým albuminem (HSA), lidským hemoglobinem (hHb) a kolagenem I. Substráty byly inkubovány s IrCL1-WT po 1 hod (HSA a hHb) nebo 7 hod (kolagen I) v pH 4,0 při 37 °C a jejich fragmentace byla analyzována pomocí SDS PAGE (obr. 4.11., str. 81). Jako kontrola sloužil vzorek bez přidaného enzymu.

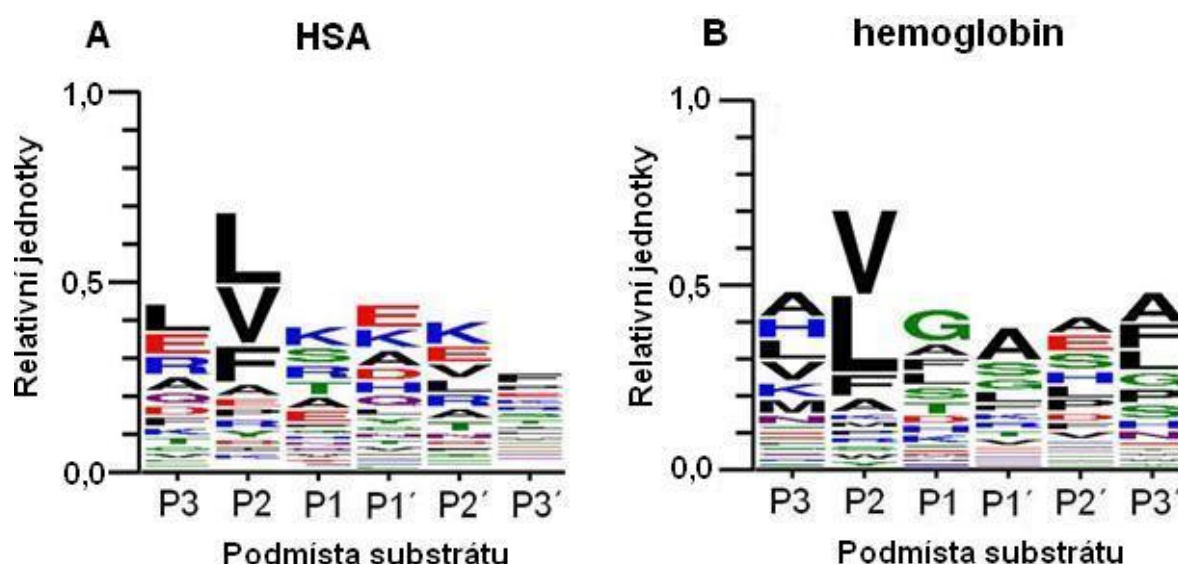
Všechny testované substráty byly IrCL1-WT efektivně degradovány - v daném časovém intervalu došlo k jejich kompletnímu rozštěpení na malé fragmenty. Z delší doby potřebné pro rozštěpení substrátu kolagenu I je patrné, že kolagen I je oproti HSA a hHb obtížněji štěpitelným substrátem.



Obr. 4.11.: **Degradace proteinových substrátů IrCL1-WT.** IrCL1-WT byl inkubován s lidským hemoglobinem (A), kolagenem I (B) a lidským sérovým albuminem (C). Reakce probíhala při pH 4,0 a 37 °C 1 hod (albumin a hemoglobin) nebo 7 hod (kolagen I). Reakční směsi byly analyzovány na SDS PAGE, gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue R250. Jako kontrola byly analyzovány vzorky neobsahující IrCL1-WT.

Jednotlivé fragmenty vznikající při štěpení HSA a hHb působením IrCL1-WT byly v dalším kroku izolovány pomocí RP-HPLC na koloně C18 a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Identifikovaná štěpná místa v sekvenci HSA a hHb jsou ukázána v příloze. Získaná data byla použita pro analýzu specifity IrCL1-WT, která byla zobrazena pomocí programu WebLogo (obr. 4.12., str. 82). V tomto programu je míra konzervovanosti sekvence v daném podmístě definována jako rozdíl mezi maximální možnou entropií a entropií distribuce dané aminokyseliny.¹⁵² Tato veličina je v obr. 4.12. vynesena na osu y v relativních jednotkách.

Výsledek ukazuje, že IrCL1-WT preferuje v pozici P2 hydrofobní aminokyseliny (zejména leucin, valin a fenylalanin) a v pozici P1 bazické a polární aminokyseliny



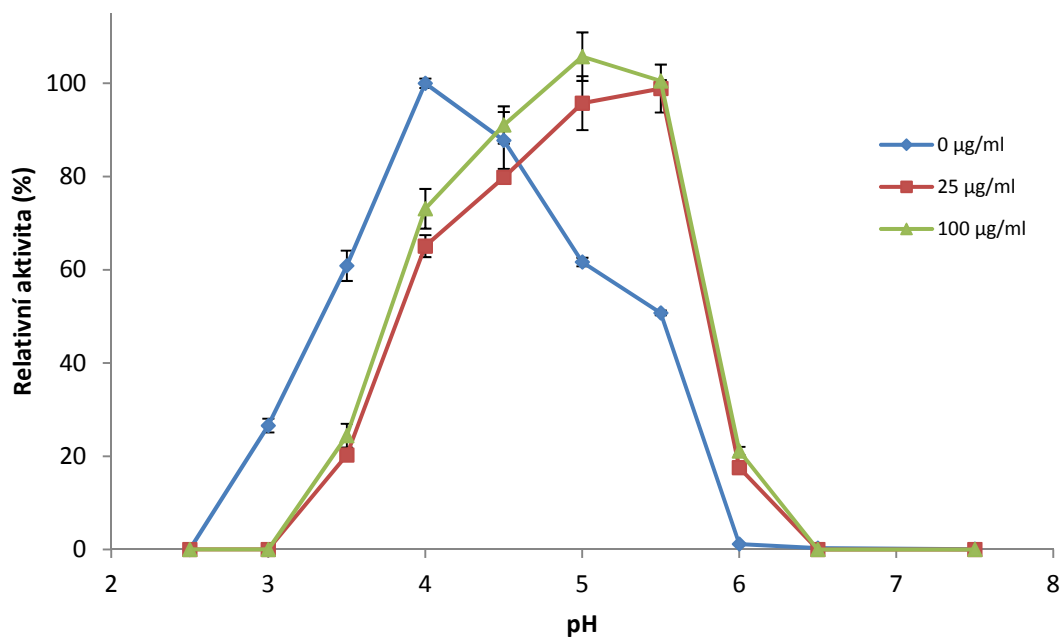
Obr. 4.12.: Substrátová specifita IrCL1-WT v jednotlivých vazebných podmístech P3-P3' odvozená od štěpení HSA (A) a hemoglobinu (B). Graf byl vytvořen programem WebLogo. Používány jsou jednopísmenné kódy aminokyselin. Výška každého písmene znázorňuje konzervovanost dané aminokyseliny v daném podmístě, zatímco celková výška sloupce je úměrná míře konzervovanosti sekvence v daném podmístě. Barevně jsou odlišeny různé skupiny aminokyselin: hydrofobní (černá), bazické (modrá), polární (zelená), kyselé (červená) a neutrální (fialová).

4.1.4.3. Modulace aktivity IrCL1 pomocí glykosaminoglykanů

Testován byl vliv vybraných glykosaminoglykanů (GAG) na aktivitu IrCL1-WT. Základním testovaným GAG byl heparin, dále byly používány chondroitin-6-sulfát a sulfatovaný polysacharid dextran sulfát.

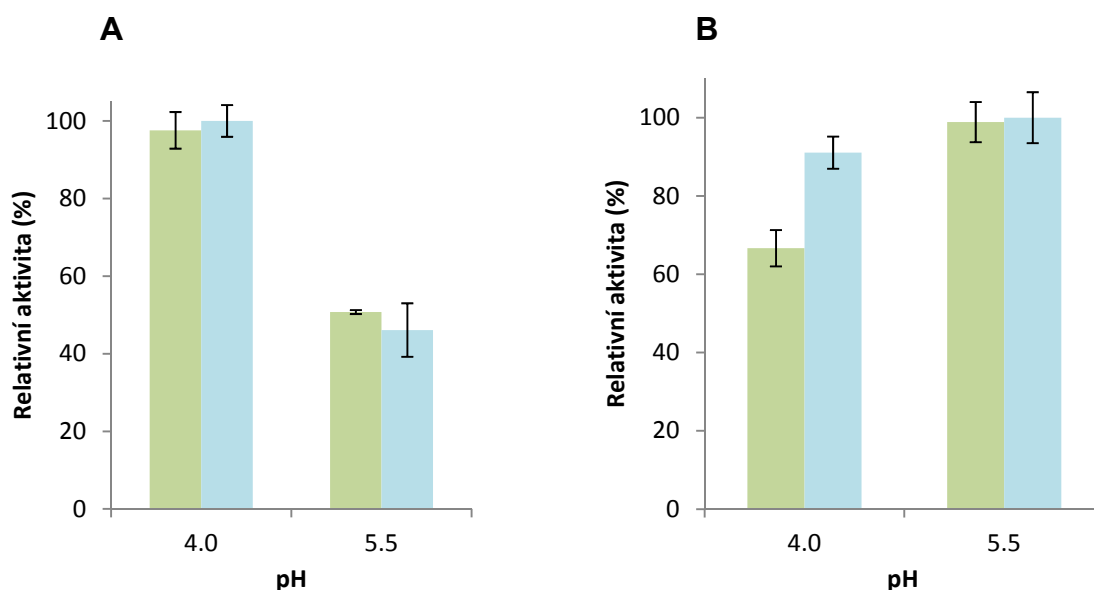
Měření aktivity probíhalo pomocí kinetického testu (kap. 3.3.5.1.) se substrátem Z-FR-AMC v přítomnosti heparinu o koncentraci $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Pozorován byl vliv heparinu na závislost proteolytické aktivity IrCL1-WT na pH (obr. 4.13., str. 83). IrCL1-WT má nejvyšší proteolytickou aktivitu v oblasti pH 4,0, v přítomnosti heparinu dochází k posunu hodnoty pH optima do oblasti kolem pH 5,0-5,5. Vliv heparinu na pH optimum byl měřen při dvou koncentracích heparinu ($25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) - obě koncentrace měly na posun aktivity téměř stejný vliv.



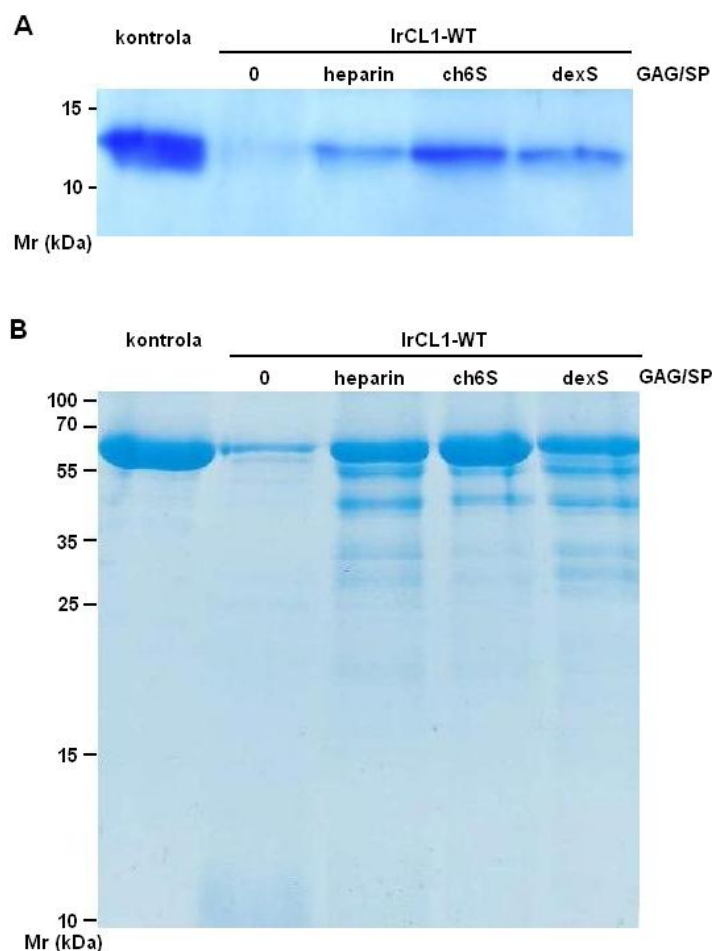
Obr. 4.13.: **Vliv heparinu na pH profil IrCL1-WT.** Aktivita IrCL1-WT byla měřena v kinetickém aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC v přítomnosti heparinu o koncentraci 25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (červená křivka) a 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (zelená křivka) a bez heparinu (modrá křivka) v citrát-fosfátových pufrech o daném pH (osa x). Procenta aktivity jsou normalizována na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty a jsou vynesena na osu y.

Vliv heparinu na aktivitu byl testován i u mutantní formy IrCL1-T212A. Byla měřena aktivita IrCL1-T212A v kinetickém aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC při pH 4,0 a 5,5 (obr. 4.14., str. 84). U IrCL1-T212A tedy dochází ke stejné modulaci aktivity vlivem heparinu jako u IrCL1-WT.



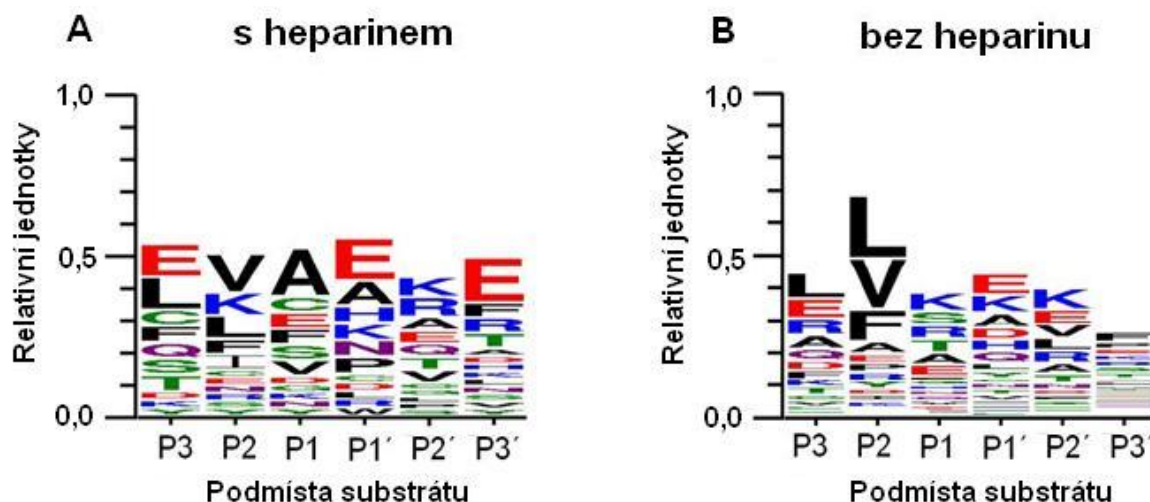
Obr. 4.14.: **Vliv heparinu na aktivitu IrCL1-WT a IrCL1-T212A.** Aktivita byla měřena v kinetickém aktivním testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC v pH 4,0 a pH 5,5 v prostředí neobsahujícím heparin (A) a v přítomnosti heparinu o koncentraci 25 µg.ml⁻¹ (B). Porovnávány byly formy IrCL1-WT (zelená) a IrCL1-T212A (modrá). Procenta aktivity jsou normalizována na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty a jsou vynesena na osu y.

Vliv GAG na aktivitu IrCL1-WT byl testován i s proteinovými substráty (HSA a hHb). Štěpení probíhalo při pH 4,0 a 37 °C 1 hod a fragmentace byla analyzována na SDS PAGE (obr. 4.15., str. 85). Jako kontrola byl zvolen vzorek bez přidaného enzymu. Vliv GAG byl porovnáván se vzorkem neobsahujícím GAG. Modulační schopnost byla testována u heparinu, chondroitin-6-sulfátu a u sulfatovaného polysacharidu dextran sulfátu. U obou proteinových substrátů bylo v přítomnosti GAG a dextran sulfátu štěpení výrazně zpomaleno, což je v souladu s výsledky měření s nízkomolekulárním fluorogenním substrátem Z-FR-AMC, kdy při pH 4,0 v přítomnosti heparinu rovněž dochází ke snížení aktivity. U obou proteinových substrátů byla aktivita nejvýrazněji snížena v přítomnosti chondroitin-6-sulfátu.



Obr. 4.15.: **Vliv glykosaminoglykanů a sulfatovaného polysacharidu dextran sulfátu (GAG/SP) na schopnost IrCL1 štěpit proteinové substráty.** IrCL1-WT byl inkubován s hHb (A) s HSA (B). Reakce probíhala 1 hod při 37 °C v pH 4,0 v přítomnosti heparinu ($25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), chondroitin-6-sulfátu (ch6S) a dextran sulfátu (dexS). Vzorek označený 0 neobsahoval žádný GAG. Jako kontrola sloužil vzorek bez přidaného enzymu. Reakční směsi byly analyzovány na SDS PAGE a gely barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.

Vliv GAG na substrátovou specifitu IrCL1-WT byl studován hmotnostně-spektrometrickou analýzou peptidových fragmentů vzniklých štěpením molekuly HSA. Výsledek je opět zobrazen pomocí programu WebLogo (obr. 4.16., str. 86). Pozorována byla změna substrátové specifity enzymu v přítomnosti heparinu, konkrétně menší preference bazických aminokyselin v podmístě P1 a nárůst preference kyselých aminokyselin v několika podmístech. Tento efekt by mohl být způsoben interakcí negativně nabitého heparinu s bazickými aminokyselinami substrátu a jejich maskováním, které snižuje produktivní vazbu s některými podmísty enzymu.



Obr. 4.16.: Porovnání substrátové specifity IrCL1 v jednotlivých vazebných podmínkách odvození od štěpení HSA v přítomnosti heparinu (A) a v nepřítomnosti heparinu (B). Grafy byly vytvořeny programem WebLogo. Na ose x jsou vynesena jednotlivá podmísta P3-P3'. Písmena odpovídají jednopísmenným symbolům pro označování aminokyselin. Výška každého písmene znázorňuje konzervovanost dané aminokyseliny v daném podmístě, zatímco celková výška sloupce je úměrná míře konzervovanosti sekvence v daném podmístě. Barevně jsou odlišeny různé skupiny aminokyselin: hydrofobní (černá), bazické (modrá), polární (zelená), kyselé (červená) a neutrální (fialová).

4.2. Katepsin L3 z klíštěte obecného

Katepsin L3 z klíštěte obecného (IrCL3) je nový isoenzym klíštěcího katepsinu L, jehož sekvence byla nedávno identifikována na Parazitologickém ústavu AV ČR.

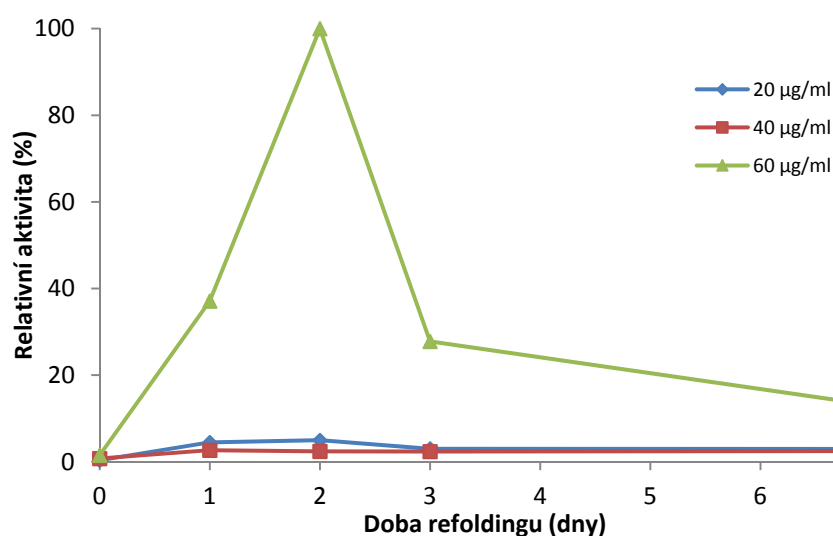
4.2.1. Refolding aktivního enzymu IrCL3 z inkluzních tělísek

Výchozím materiálem byl rekombinantní proenzym IrCL3, který byl z inkluzních tělísek *E. coli* získán přečištěním pomocí niklové afinitní chromatografie (Ni-NTA). Tento materiál poskytl Dr. Kopáček z Parazitologického ústavu AV ČR. S takto purifikovaným denaturovaným enzymem byl proveden refolding.

Denaturovaný zymogen IrCL3 (proIrCL3) byl přidán do preinkubačního roztoku obsahujícího 50 mM GSH (pro redukci thiolových skupin cysteinu) na výslednou koncentraci proteinů 200-600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.¹⁴⁴ Tato směs byla po hodinové inkubaci za laboratorní teploty postupně přidána do desetinásobného objemu refoldingové směsi o složení 50 mM Tris pH 8; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG a celkové koncentraci proteinů 20-60 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Refolding probíhal po dobu 7 dní při 4 °C a každý den

byla účinnost refoldingu proIrCL3 stanovována pomocí kinetického aktivního testu se substrátem Z-FR-AMC (obr. 4.17). Aktivní test obsahoval úvodní aktivační krok v kyselém pH umožňující konverzi proIrCL3 na aktivní enzym.

Z experimentu vyplývá, že nejvhodnější koncentrace proIrCL3 v refoldingové směsi je $60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (obr. 4.17.). V refoldingových směsích o nižší koncentraci proteinu byl refolding málo účinný. Optimální doba pro proces sbalení proIrCL3 je dva dny, v této době byla aktivita enzymu největší.



Obr. 4.17.: **Závislost účinnosti refoldingu proIrCL3 na koncentraci proteinu a době refoldingu.** Refolding probíhal po dobu 7 dní (osa x) v refoldingové směsi o složení 50 mM Tris pH 8; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG a celkové koncentraci proteinů $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (modrá), $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (červená) a $60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (zelená). Aktivita byla měřena v aktivním testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Na ose y je vynesena aktivita vyjádřená v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaná na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty a přepočítaná na $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ proteinu.

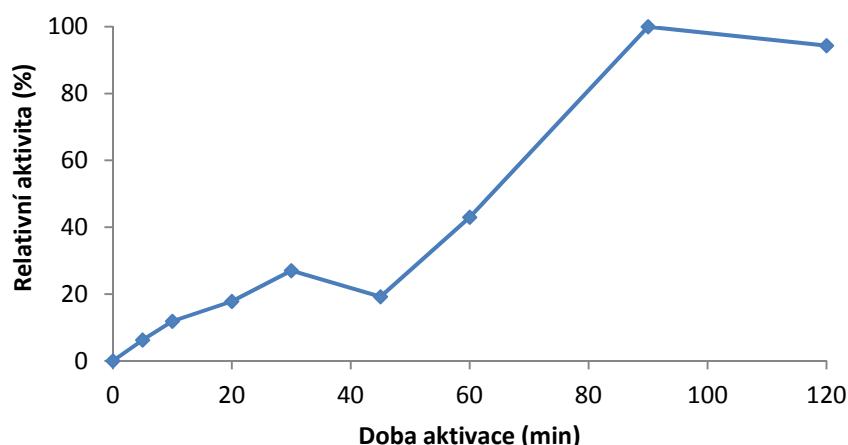
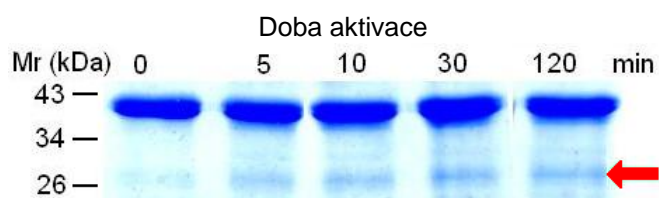
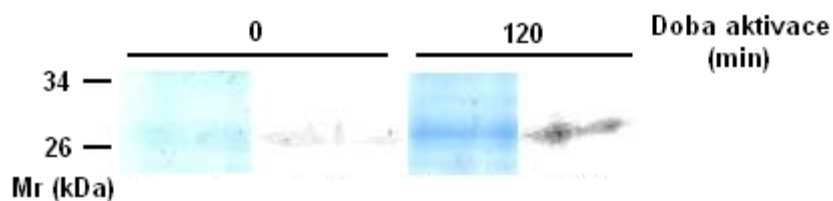
4.2.2. Biochemické vlastnosti IrCL3

4.2.2.1. Porovnání vlastností IrCL3 s homology

Byla testována schopnost aktivace proIrCL3 při pH 4,0 autokatalytickým mechanismem. V různých časových intervalech byla měřena proteolytická aktivita IrCL3 v aktivním testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (obr. 4.18., str. 89). Tato analýza ukázala, že proIrCL3 je schopen autoaktivace v kyselém pH jako je tomu u IrCL1 i řady známých katepsinů L. IrCL3 se kompletně aktivoval za 90 min od počátku aktivace, při delší inkubaci nedocházelo k další aktivaci.

Průběh autoaktivace při pH 4,0 byl rovněž analyzován pomocí SDS PAGE. Aktivace se sledovala po dobu 2 hod a v uvedených časových intervalech byly odebírány vzorky aktivační směsi, které byly po provedení SDS PAGE proteinově obarveny. Výsledek ukazuje zvyšování intenzity pásu o velikosti asi 28 kDa, který pravděpodobně obsahuje aktivní formu IrCL3 (teoretická molekulová hmotnost asi 29 kDa).

Aktivní forma IrCL3 byla identifikována vizualizací aktivitní fluorescenční značkou BoRC v aktivační směsi po 120 minutové aktivaci, pro srovnání byl značen i vzorek, který nebyl předem aktivován. Je vidět efektivní interakce se značkou pouze ve vzorku, u kterého před značením proběhla aktivace, kde je patrný pás o velikosti přibližně 28 kDa náležící aktivnímu IrCL3 (obr. 4.18., str. 89).

A**B****C**

Obr. 4.18.: **Průběh autoaktivace proIrCL3.**

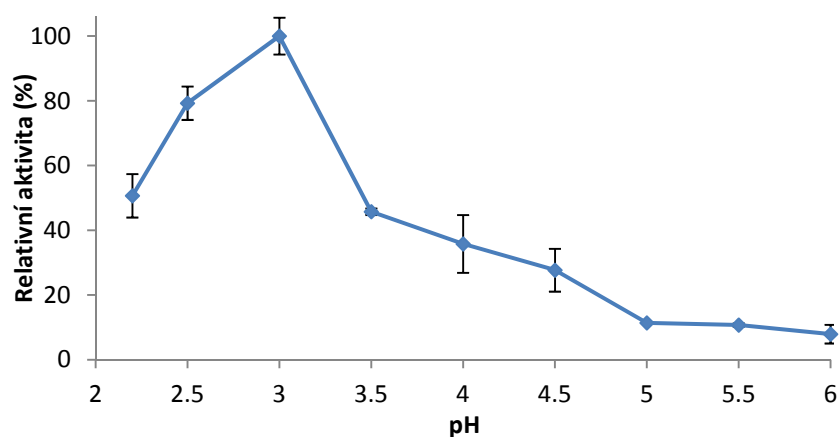
A) ProIrCL3 byl aktivován v pH 4,0 a v daných časových intervalech (osa x) byla měřena proteolytická aktivita v kinetickém aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

B) Analýza procesu aktivace IrCL3 pomocí SDS PAGE. ProIrCL3 byl aktivován v pH 4,0. V časových intervalech byly odebírány vzorky na SDS PAGE. Patrné je přibývání intenzity pásu o Mr asi 28 kDa (červená šipka). Gel byl obarven pomocí Coomasie Brilliant Blue R250.

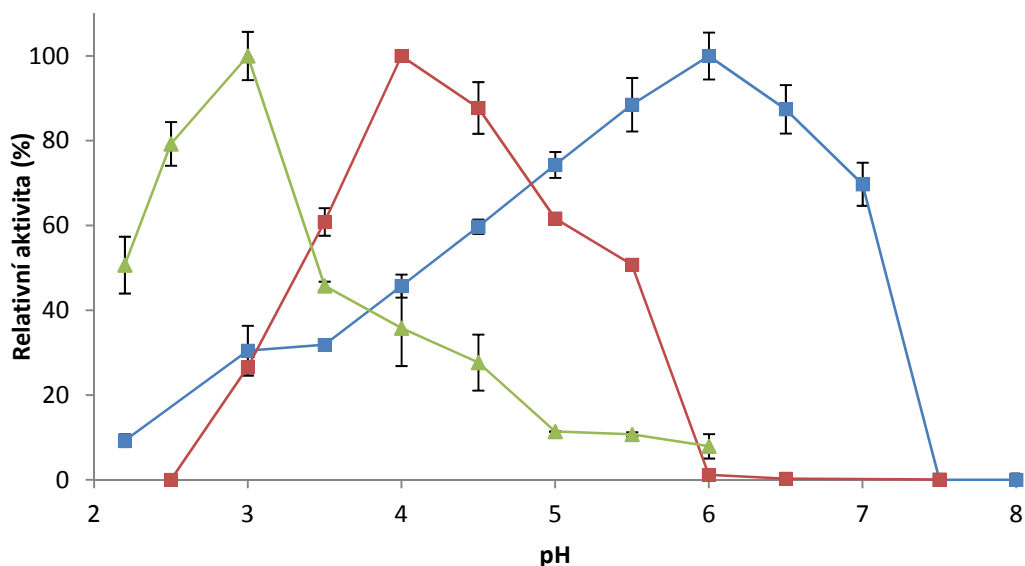
C) Identifikace aktivní formy IrCL3 pomocí aktivní fluorescenční značky BoRC. Aktivovaný (120 min) a neaktivovaný (0 min) vzorek IrCL3 byl inkubován s BoRC (próba), následně separován pomocí SDS PAGE. Aktivní IrCL3 byl vizualizován pomocí fluorescenčního skeneru a výsledek porovnáván s gelem obarveným pomocí Coomasie Brilliant Blue R250 (protein).

Závislost proteolytické aktivity IrCL3 na pH byla analyzována pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (kap. 3.3.5.1.). Maximální aktivita byla

naměřena v prostředí o pH 3,0 (obr. 4.19). Optimální pH pro proteolytickou aktivitu IrCL3 je tedy nižší než pH optimum IrCL1 (pH 4,0). Hodnota pH optima IrCL1 a IrCL3 byla dále porovnávána s optimálním pH pro proteolytickou aktivitu lidského katepsinu L izolovaného z jaterní tkáně (hCL). Jeho pH optimum se nachází v oblasti pH 5,5-6,5 (obr. 4.20.).



Obr. 4.19.: **Stanovení pH optima IrCL3.** Proteolytická aktivita IrCL3 byla měřena s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC v citrát-fosfátových pufrch o pH 2,2-6. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).



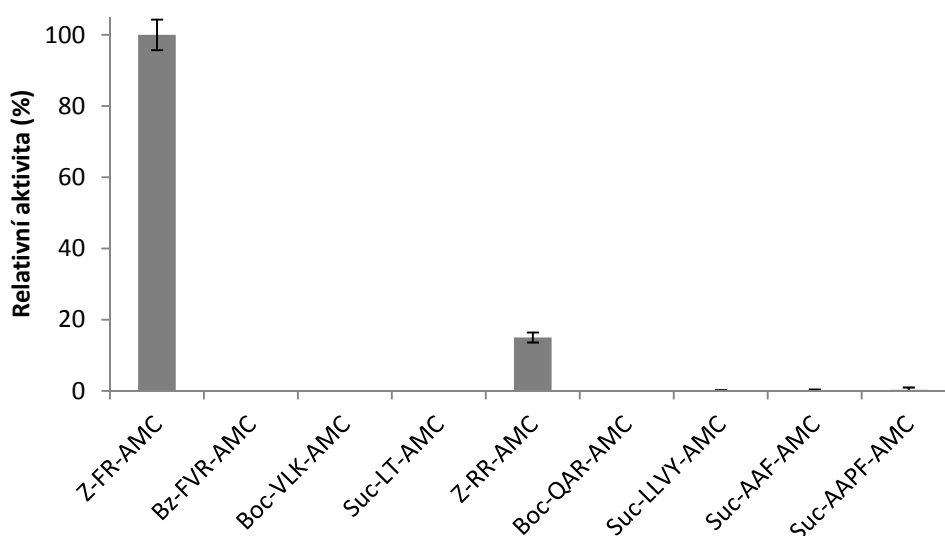
Obr. 4.20.: **Porovnání závislosti proteolytické aktivity IrCL1 (červená), IrCL3 (zelená) a hCL (modrá) na pH.** Aktivita byla měřena v kinetickém testu se substrátem Z-FR-AMC v citrát-fosfátových pufrch o daném pH (osa x). Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty pro daný enzym (osa y).

4.2.2.2. Substrátová specifita IrCL3

Nízkomolekulární syntetické substráty

Substrátová specifita IrCL3 byla testována se sadou syntetických peptidových fluorogenních substrátů (obr. 4.21.). Měření probíhalo v prostředí o pH 3,0, ve kterém IrCL3 vykazuje maximální aktivitu (kap. 4.2.2.1.).

Nejlépe byl štěpen substrát Z-FR-AMC. Dále byl s menší účinností štěpen pouze substrát Z-RR-AMC. Ostatní substráty IrCL3 neštěpil.

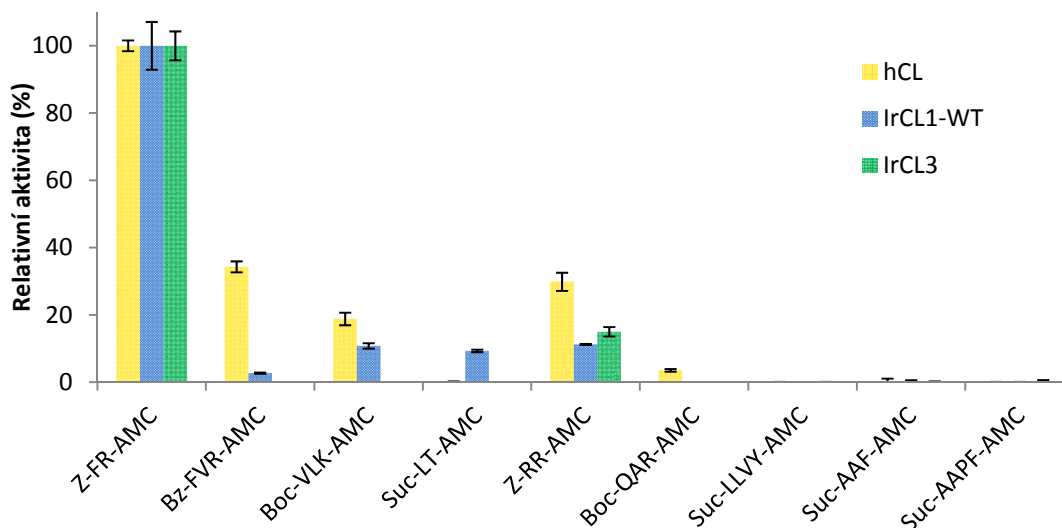


Obr. 4.21.: **Substrátová specifita IrCL3.** Aktivita IrCL3 byla měřena v kinetickém aktivním testu v pH 3,0 s uvedenými peptidovými fluorogenními substráty (osa x). Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

V dalším kroku byla porovnávána substrátová specifita IrCL3 s IrCL1 a hCL (obr. 4.22., str. 92). Sada peptidových fluorogenních substrátů byla testována v oblasti pH optima jednotlivých enzymů (IrCL3 pH 3,0; IrCL1 pH 4,0; hCL pH 5,5).

Je vidět, že kromě Z-FR-AMC štěpí hCL dobře i substráty Z-RR-AMC, Bz-FVR-AMC a Boc-VLK-AMC. S menší účinností byl též štěpen substrát Boc-QAR-AMC, který nebyl štěpen IrCL1 ani IrCL3. IrCL1 na rozdíl od hCL neštěpil Boc-QAR-AMC, štěpil však Suc-LT-AMC, který nebyl štěpen hCL. IrCL1 a hCL tak mají čtyři společné substráty (Z-FR-AMC, Bz-FVR-AMC, Boc-VLK-AMC a Z-RR-AMC) štěpené s rozdílnou relativní efektivitou. IrCL3 štěpil pouze Z-FR-AMC a s menší účinností Z-RR-AMC.

Je patrné, že všechny enzymy mají nejvyšší aktivitu se substrátem Z-FR-AMC. Nejvíce vyhraněnou substrátovou specifitu má IrCL3, který kromě Z-FR-AMC štěpí pouze Z-RR-AMC. Z-RR-AMC je současně jediným substrátem, který je společně štěpen všemi třemi testovanými enzymy.



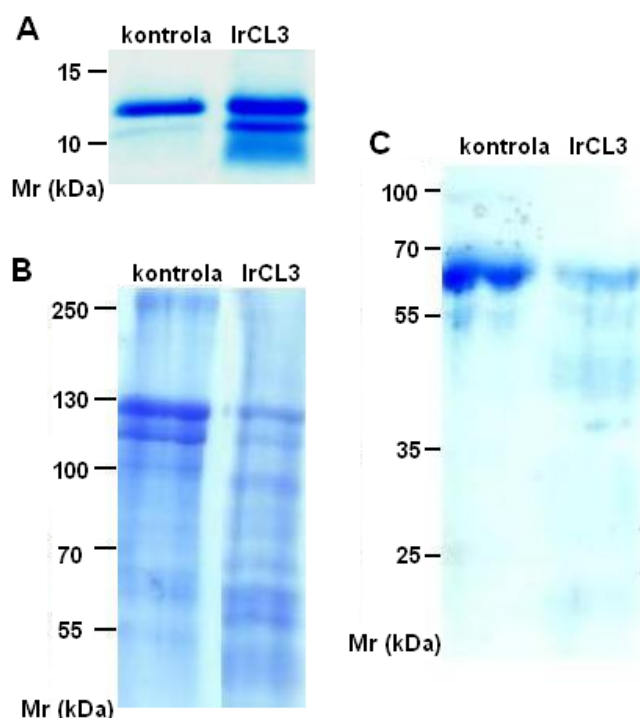
Obr. 4.22.: **Porovnání substrátových specifit IrCL1 (modrá), IrCL3 (zelená) a hCL (žlutá).** Aktivita enzymů byla měřena v kinetickém aktivním testu s uvedenými peptidovými fluorogenními substráty (osa x). Měření probíhalo v citrát-fosfátových pufrch pH 3,0 (IrCL3), pH 4,0 (IrCL1) a pH 5,5 (hCL). Stanovení aktivity je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty pro daný enzym (osa y).

Degradace proteinových substrátů

Schopnost IrCL3 degradovat proteinové substráty byla testována s HSA, hHb a kolagenem I. Substráty byly inkubovány s IrCL3 při pH 3,0 (pH odpovídající pH optimu IrCL3, obr. 4.19, str. 90) a 37 °C a fragmentace byla analyzována pomocí SDS PAGE a proteinového barvení. HSA a hHb byly štěpeny 1 hod, degradace kolagenu I probíhala 7 hod za uvedených podmínek. Jako kontrola sloužil vzorek bez přidaného enzymu (obr. 4.23., str. 93).

Všechny testované substráty byly IrCL3 degradovány (obr. 4.23, str. 93). U hHb je patrná úvodní fragmentace molekuly na fragmenty o velikosti přibližně 10 kDa, menší

peptidy jsou mimo rozlišení použité SDS PAGE. HSA byl efektivně degradován až na malé peptidy. Naproti tomu při degradaci kolagenu I byly generovány především velké fragmenty v širokém rozmezí molekulových hmotností asi 50-100 kDa. Z delší doby potřebné pro rozštěpení substrátu kolagenu I je patrné, že kolagen I je oproti HSA a hHb obtížněji štěpitelným substrátem.



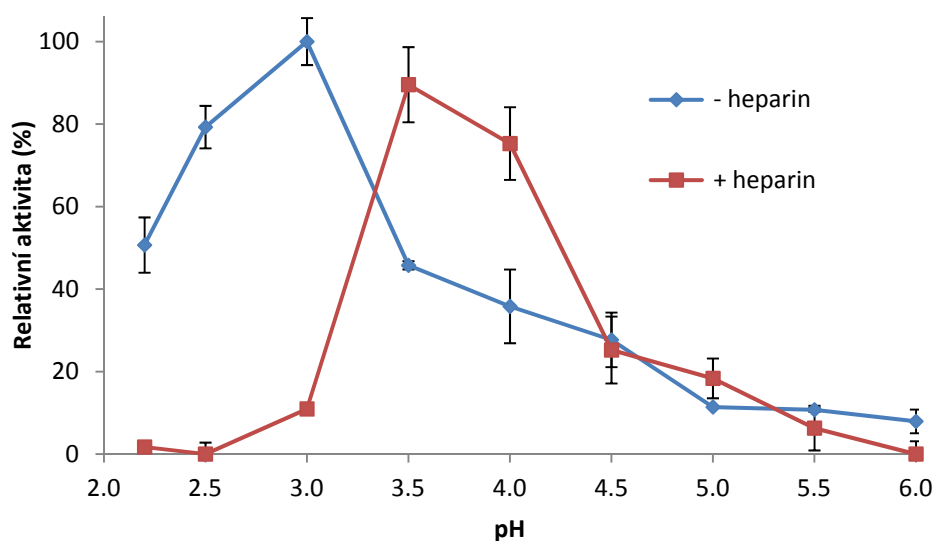
Obr. 4.23.: **Analýza degradace proteinových substrátů IrCL3.** Separace reakční směsi na SDS PAGE po štěpení: (A) lidského hemoglobinu, (B) kolagenu I, (C) lidského sérového albuminu. Reakce probíhala při pH 3,0 a 37 °C. Degradace albuminu a hemoglobinu probíhala 1 hod, degradace kolagenu I trvala 7 hod. Jako kontrola sloužil substrát bez přidaného enzymu. Proteiny byly v gelu barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.

4.2.2.3. Modulace aktivity pomocí glykosaminoglykanů

Testován byl vliv vybraných GAG na aktivitu IrCL3. Jako modelový GAG byl použit heparin.

Vliv heparinu na závislost proteolytické aktivity IrCL3 na pH byl analyzován pomocí kinetického testu (kap. 3.3.5.1.) se substrátem Z-FR-AMC v 0,15 M citrát-fosfátových pufrch pH 2,2-6,0 v přítomnosti heparinu o koncentraci 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledek ukazuje vliv heparinu na závislost proteolytické aktivity IrCL3 na pH (obr. 4.24., str. 94),

kdy v přítomnosti heparinu dochází k posunu hodnoty pH optima z oblasti pH 3,0 do oblasti kolem pH 3,5-4,0.



Obr. 4.24.: **Vliv heparinu na závislost proteolytické aktivity IrCL3 na pH.** Aktivita IrCL3 byla měřena v kinetickém aktivním testu se substrátem Z-FR-AMC v přítomnosti heparinu o koncentraci $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (červená křivka) a bez heparinu (modrá křivka) v citrát-fosfátových pufrch o daném pH (osa x). Procenta aktivity jsou normalizována na 100 % nejvyšší naměřené hodnoty a jsou vynesena na osu y.

5. Diskuse

Diplomová práce se zabývá katepsinem L z klíštěte obecného (*I. ricinus*). Podle analogie s klíštětem *I. scapularis*, jehož genom obsahuje tři geny pro katepsin L (IsCL1-IsCL3) lze i u klíštěte *I. ricinus* očekávat až tři isoenzymy katepsinu L (IrCL1-IrCL3).¹⁴¹ Konkrétně byly studovány isoenzymy IrCL1 a IrCL3. Hlavní funkcí IrCL1 je intracelulární degradace živin ve střevních buňkách klíštěte.¹⁸ Funkce IrCL3 dosud není známa. Cílem práce bylo exprimovat IrCL1, izolovat ho a dále analyzovat jeho proteolytickou aktivitu a možnosti její regulace. Aminokyselinová sekvence proenzymu IrCL1 byla určena z cDNA knihovny střevní tkáně klíštěte *I. ricinus*, kde je tento enzym exprimován.¹⁷ Isoenzym IrCL3 byl exprimován v systému *E. coli* a byl mi poskytnut v rámci spolupráce s Parazitologickým ústavem AV ČR Dr. Petrem Kopáčkem. Při práci s isoenzymem IrCL3 bylo cílem analyzovat průběh aktivace proenzymu a dále studium jeho proteolytické aktivity a možnosti její regulace.

Molekula přirozeného IrCL1 (IrCL1-WT) obsahuje dva sekvenční signály pro potenciální N-glykosylaci.¹⁷ Protože přítomnost N-glykanů by mohla způsobovat problémy při plánované krystalizaci IrCL1, byla v kvasinkách *P. pastoris* společně s IrCL1-WT exprimována i mutantní forma IrCL1 s redukováným počtem N-glykanů (IrCL1-T212A). Molekulové hmotnosti rekombinantních forem byly porovnávány pomocí SDS PAGE a specifické fluorescenční značky BoRC interagující s aktivním místem IrCL1. Molekulová hmotnost IrCL1-WT je podle této analýzy přibližně 33 kDa, molekulová hmotnost IrCL1-T212A přibližně 30 kDa. Pozorovaný pokles molekulové hmotnosti naznačuje přítomnost N-glykanu v pozici 212, která je tedy ve formě IrCL1-WT využita při glykosylaci. S těmito dvěma formami IrCL1 byl porovnáván autentický IrCL1 vizualizovaný pomocí specifické aktivní značky BoRC v homogenátu střevní tkáně *I. ricinus*. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 30 kDa. Opět je patrný pokles molekulové hmotnosti oproti formě IrCL1-WT, což naznačuje vyšší míru glykosylace IrCL1-WT exprimovaného v kvasinkách *P. pastoris*, které jsou známy hyperglykosylací heterologně exprimovaných proteinů.¹⁴³

Optimální pH pro proteolytickou aktivitu IrCL1 je v kyselé oblasti pH 3,5-4,0.^{141,159} Tuto skutečnost potvrzují i výsledky uvedené v této práci. Uvedená hodnota pH optima rekombinantního IrCL1 odpovídá hodnotě pH optima proteolytické aktivity naměřené v homogenátu střevní tkáně *I. ricinus*.¹⁸ Tato hodnota pH optima byla nalezena i u katepsinu L klíštěte *Haemaphysalis longicornis*.²¹ U IrCL3 byla nalezena optimální aktivita ve

výrazně kyselé oblasti kolem pH 3,0, tedy v oblasti, kde je stabilita IrCL1 již velice nízká. Výrazně kyselé pH optimum katepsinu L z klíšťat je nižší než u savčích katepsinů, u kterých se pohybuje v rozmezí pH 5,5-6,5.¹⁵⁵ Kyselé pH optimum IrCL1 vykazuje podobnost s kyselým pH optimem katepsinu D z klíštěte obecného a i funkce IrCL1 v počátečních fázích degradace proteinových substrátů je podobná klíštěcímu katepsinu D.¹⁸ Fyziologický význam nízkého pH optima u IrCL1 pravděpodobně souvisí s lokalizací v kyselých trávicích organelách (lysosomech) buněk střevní tkáně klíštěte, jejichž funkce může být regulována pomocí pH. Lokalizace IrCL3 v současnosti není známa, ale vzhledem ke kyselému pH optimu, podobně jako u IrCL1, se může účastnit úvodních fází degradace proteinových substrátů v lysosomech. U IrCL3 byla dále ukázána schopnost autokatalytické aktivace v kyselém pH. Tato vlastnost byla popsána i u IrCL1.^{141,153} Oba enzymy tak mají stejný mechanismus aktivace, který se pravděpodobně uplatní po jejich transportu do kyselých lysozomů.

Pro zjištění vlivu modifikace na aktivitu IrCL1-T212A bylo porovnáváno pH optimum této modifikované formy s přirozeným IrCL1-WT. Výsledek ukazuje, že zmíněná modifikace nemá výrazný vliv na závislost aktivity IrCL1-T212A na pH. Detailnější analýza vlivu mutace na proteolytickou aktivitu byla provedena pomocí porovnání základních kinetických konstant k_{kat} , K_m a katalytické účinnosti k_{kat}/K_m pro obě formy IrCL1-WT a IrCL1-T212A. Michaelisova konstanta K_m nebyla výrazněji změněna a provedená mutace tak nemá vliv na vazbu substrátu do aktivního místa IrCL1-T212A. Číslo přeměny (k_{kat}) bylo nalezeno u IrCL1-T212A asi 37 krát nižší než u IrCL1-WT, což mělo za následek pokles katalytické účinnosti (poměr k_{kat}/K_m) IrCL1-T212A oproti IrCL1-WT. Z této analýzy vyplývá, že IrCL1-T212A je katalyticky aktivní a může tak být v budoucnosti použit jako funkční forma IrCL1 při krystalizačních experimentech.

IrCL1 je trávicí enzym, jehož hlavní funkcí in vivo je degradace krevních proteinů ve formě živin. Proto byla tato schopnost IrCL1 testována in vitro se dvěma proteiny - hemoglobinem a HSA, které jsou v krvi nejhojnější (hemoglobin asi 160 g.l⁻¹, albumin asi 50 g.l⁻¹). Byla ukázána efektivní degradace těchto substrátů. Dále je IrCL1 exprimován ve slinných žlázách a je následně sekretován do slin, kde potenciálně může hrát roli při degradaci pojivových tkání při průniku klíštěte do hostitele.¹⁵⁹ Za tímto účelem byla ověřována schopnost degradace kolagenu. Výsledkem bylo efektivní štěpení tohoto substrátu, což u katepsinů L z jiných organismů není obvyklé. Schopnost degradace proteinových substrátů (HSA, hemoglobin, kolagen) byla prokázána i u IrCL3.

Substrátová specifita IrCL1 byla v této práci určena pomocí kinetických testů se sadou fluorogenních syntetických substrátů a pomocí hmotnostně-spektrometrické analýzy peptidových fragmentů získaných štěpením proteinových substrátů HSA a hemoglobinu. Získané výsledky ukazují nejvýraznější specifitu ve vazebném podmístě P2, kde jsou preferovány zejména hydrofobní aminokyseliny (leucin, valin a fenylalanin). Tento výsledek je ve shodě se substrátovou specifikou IrCL1 určenou pomocí kombinatorní knihovny fluorogenních substrátů.¹⁴¹ Je také podobný substrátové specifikě katepsinu L klíštěte *Rhipicephalus microplus*²² a substrátové specifikě proteas typu katepsinu L z parazitických prvoků a motolic a lidského katepsinu L.^{107,158} Novým rysem substrátové specifity IrCL1 a IrCL3 je degradace substrátu Z-RR-AMC obsahující arginin v pozici P2, který podle údajů v literatuře není u katepsinů L v této pozici preferován.^{22,107,158}

Glykosaminoglykany a sulfatované polysacharidy (GAG/SP) jsou známy jako makromolekuly schopné interakce s cysteinovými katepsiny. K interakci dochází prostřednictvím iontových interakcí mezi kladně nabitými bazickými aminokyselinami na povrchu enzymu a záporně nabitými kyselými skupinami v molekule GAG/SP. GAG/SP například urychlují aktivaci lidských katepsinů B a L.^{118, 120} U lidského katepsinu S způsobují GAG/SP posun pH optima autokatalytické aktivace z kyselé oblasti pH do neutrální oblasti.¹²² V přítomnosti GAG/SP dochází dále ke stabilizaci katepsinu K při fyziologickém pH¹²⁵ a ke zvýšení schopnosti degradace kolagenu.¹²³ V této práci byl pozorován posun pH optima proteolytické aktivity IrCL1 (měřené s peptidovým substrátem Z-FR-AMC) v přítomnosti heparinu z oblasti pH 4,0 do oblasti pH 5,0-5,5. Podobný efekt byl pozorován i u IrCL3, kdy došlo k posunu této hodnoty z oblasti pH 3,0 do oblasti pH 3,5-4,0. Zároveň došlo k poklesu aktivity v oblasti pH optima měřené v nepřítomnosti GAG/SP (IrCL1 pH 4,0; IrCL3 pH 3,0). Tato skutečnost byla potvrzena sníženou schopností IrCL1 degradovat proteinové substráty HSA a hemoglobin při pH 4 v přítomnosti heparinu, chondroitin-4-sulfátu a dextran sulfátu. Tento výsledek poprvé ukazuje možnost modulace aktivity katepsinu L pomocí GAG/SP, což doposud nebylo studováno.

6. Závěr

Práce se zabývala analýzou proteolytické aktivity dvou isoenzymů katepsinu L z klíštěte *I. ricinus* – IrCL1 a IrCL3.

Hlavní závěry studie isoenzymu IrCL1:

- Místně specifickou mutagenezí byly připraveny konstrukty IrCL1 s redukováným počtem sekvenčních signálů pro potenciální N-glykosylaci. Tyto modifikované formy IrCL1 budou použity pro krystalizační analýzu.
- Dvě formy IrCL1 – přirozená forma IrCL1-WT (se dvěma N-glykany) a mutantní forma IrCL1-T212A (s jedním N-glykanem) byly připraveny jako rekombinantní proteiny v expresním systému *P. pastoris*. Byly purifikovány pomocí iontoměničové a gelové chromatografie.
- Mutantní forma IrCL1-T212A má podobnou hodnotu pH aktivního optima a Michaelisovy konstanty jako IrCL1-WT, ale vykazuje nižší katalytickou účinnost
- Byla zjištěna schopnost IrCL1-WT degradovat in vitro proteinové substráty, které jsou fyziologicky relevantní (hemoglobin, HSA, kolagen).
- Substrátová specifita IrCL1-WT byla určena pomocí sady fluorogenních peptidových substrátů a pomocí hmotnostně-spektrometrické analýzy peptidových fragmentů vzniklých štěpením HSA a hemoglobinu
- Bylo zjištěno, že proteolytická aktivita IrCL1-WT je modulována pomocí glykosaminoglykanů a sulfatovaných polysacharidů. V přítomnosti heparinu dochází k posunutí pH optima z oblasti pH 3,5-4,0 do oblasti pH 5,0-5,5.

Hlavní závěry studie isoenzymu IrCL3:

- Rekombinantní IrCL3 byl refoldován z denaturovaného proteinu produkovaného v inkluzních těliscích *E. coli*. Aktivní forma IrCL3 byla získána autoaktivací v kyselém pH.

- Funkční vlastnosti IrCL3 v řadě aspektů připomínají isoenzym IrCL1. Pomocí peptidových fluorogenních substrátů bylo zjištěno, že substrátová specifita IrCL3 je podobná substrátové specifitě IrCL1, ale pH optimum bylo nalezeno ve více kyselé oblasti pH 3,0-3,5. IrCL3 je také schopen efektivně degradovat stejné proteinové substráty jako IrCL1 a jeho aktivita je také modulována interakcí s glykosaminoglykany.

7. Přílohy

Štěpná místa IrCL1 v molekulách proteinových substrátů

Štěpení HSA - 30 min

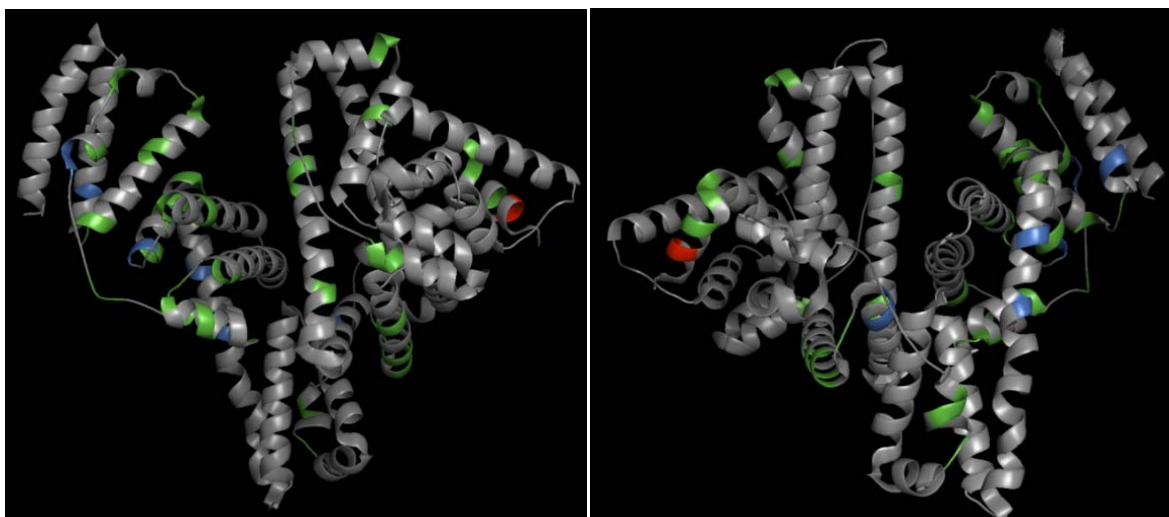
mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
edhvklnvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatltretyge madccakqep
ernecflqhk ddnpnlprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldeir degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdlllecadd radlakyice nqdsissklk
eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
rhpdyssvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
qlgey[▼]kf[▼]qna llvrytkkvp qvstptlvev[▼] srnlgkvgs cckhpeakrm pcaedylsvv
lnqlcvlhek[▼] tpvsdrvtkc cteslvnrrp[▼] cfsalevdet yvpkefnaet[▼] ftfhadictl
sekerqikkq talvelvkhk[▼] pkatkeqlka[▼] vmddfaafve[▼] kcckaddket cfaeegkklv
aasqaalgl

Je uvedena sekvence HSA. Zelené šipky označují štěpná místa po 30 min štěpení IrCL1-WT. Oblasti sekvence identifikované hmotnostním spektrometrem jsou podtrženy.

Štěpení HSA - 180 min

mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfdlge enfkalvlia faqylqqcpf
edhvklnvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatltretyge madccakqep
ernecflqh ddnplprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldel degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdlllecadd radlakyice nqdsissklk
eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
rhpdysvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepgn likqncelfe
qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
lnqlcvlhek tpvsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kckkaddket cfaeegkklv
aasqaalg1

Je uvedena sekvence HSA. Zelené šipky označují štěpná místa po 180 min štěpení IrCL1-WT. Oblasti sekvence identifikované hmotnostním spektrometrem jsou podtrženy.



Trojrozměrný model HSA (PDB: 1E7I). Levý a pravý obrázek představují tutěž molekulu rotovanou o 180 °. Barevně jsou znázorněny aminokyseliny ve vazebných pozicích P1-P1' v molekule substrátu. Vazba mezi těmito aminokyselinami byla štěpena IrCL1-WT. Barevně je rozlišena frekvence štěpení dané vazby: červená – vysoká frekvence, modrá – střední frekvence, zelená – nízká frekvence.

Štěpení HSA - 180 min v přítomnosti heparinu

mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfdlge enfkalvlia faqylqqcpf
edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatltretyge madccakqep
ernecflqhk ddnplprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylieiarrh pyfyapellf
fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldeir degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllecadd radlakyice nqdsissklk
eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
rhpdyssvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptllev srnlgkvgsckckhpeakrm pcaedylsvv
lnqlcvlhek tpsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
sekerqikkq talvelvkhhk pkatkeqlka vmddfaafve kcckaddket cfaeegkklv
aasqaalg1

Je uvedena sekvence HSA. Zelené šipky označují štěpná místa po 180 min štěpení IrCL1-WT. Oblasti sekvence identifikované hmotnostním spektrometrem jsou podtrženy.

Štěpení hHb - 30 min

α -podjednotka

MVLSPADKTNVKA[▼]AWGKVG[▼]AHAGEYGA[▼]EALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
KKVADALTN[▼]AVAHVDDMPNALS[▼]SDLHAHKL[▼]RVD[▼]PVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP
AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR

β -podjednotka

MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPK
VKAHGKKVLGAFSDGLAHL[▼]DNLKGTFATLSELHCDKLHVD[▼]PENFRLLGNVLVCVLAHHFG
KEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH

Je uvedena sekvence hHb. Zelené šipky označují štěpná místa po 30 min štěpení IrCL1-WT. Oblasti sekvence identifikované hmotnostním spektrometrem jsou podtrženy.

Štěpení hHb - 180 min

α -podjednotka

MVLSPADKTNVKA[▼]AWGKVG[▼]AHAGEYGA[▼]EALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
KKVADALTN[▼]AVAHVDDMPNALS[▼]SDLHAHKL[▼]RVD[▼]PVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP
AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR

β -podjednotka

MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPK
VKAHGKKVLGAFSDGLAHL[▼]DNLKGTFATLSELHCDKLHVD[▼]PENFRLLGNVLVCVLAHHFG
KEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH

Je uvedena sekvence hHb. Zelené šipky označují štěpná místa po 180 min štěpení IrCL1-WT. Oblasti sekvence identifikované hmotnostním spektrometrem jsou podtrženy.

8. Použitá literatura

- ¹ Volf, P.; Horák, P. *Paraziti a jejich biologie*; Triton: Praha, 2007.
- ² Jongejans, F.; Uilenberg, G. Global importance of ticks. *Parasitology* **2004**, *129* (S), 3–14.
- ³ Schmidt, G. S.; Roberts, L. S. *Foundations of Parasitology*, 7th ed.; Mc Graw Hill: Int. Ed., 2006.
- ⁴ Encyclopedic reference of parasitology (<http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php>) (28.3.2010)
- ⁵ Goddard, J. Tick-Borne Diseases. *Infectious Diseases and Arthropods*, 2nd ed.; Humana Press, 2008; pp 81–129.
- ⁶ <http://www.naturephoto-cz.eu/pic/krasensky/ixodes-ricinus-1719.jpg> (23. 12.2011)
- ⁷ Rosický, B.; Černý, V.; Daniel, M.; Dusbábek, F.; Palička, P.; Samšínák, K. *Roztoči a klišťata škodící zdraví člověka*; Academia: Praha, 1979.
- ⁸ http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ixodes_ricinus.pdf
- ⁹ <http://www.cdc.gov/Ncidod/eid/vol6no4/fournierG1.htm> (12.1.2010)
- ¹⁰ Randolph, S. E. Epidemiological consequence of the ecological physiology of ticks. *Adv. Ins. Phys.* **2009**, *37*, 297–339.
- ¹¹ <http://www.tbe-info.com/tbe.aspx?target=52001&l=2> (27.12.2011)
- ¹² http://www.dogalTEDAVI.net/gallery2/key/Kene?g2_itemId=12620 (27.12.2011)
- ¹³ Franta, Z.; Frantová, H.; Konvičková, J.; Horn, M.; Sojka, D.; Mareš, M.; Kopáček, P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasit. Vectors* **2010**, *3* (119),
- ¹⁴ Agyei, A. D.; Runham, N. W. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of blood meal. *Int. J. Parasitol.* **1995**, *22*, 55–62.
- ¹⁵ Lara, F. A.; Lins, U.; Bechara, U. G.; Oliveira, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 3093–3101.
- ¹⁶ Kaufman, R.; Aeschlimann, A. A.; Diehl, P. A. Regulation of body volume by salivation in a tick challenged with fluidal loads. *Am. J. Physiol.* **1980**, *238*, 102–112.
- ¹⁷ Sojka, D.; Franta, Z.; Horn, M.; Hajdušek, O.; Caffrey, C. R.; Mareš, M.; Kopáček, P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit. Vectors* **2008**, *1*, 7.
- ¹⁸ Horn, M.; Nussbaumerová, M.; Šanda, M.; Kovářová, Z.; Srba, J.; Franta, Z.; Sojka, D.; Bogyo, M.; Caffrey, C. R.; Kopáček, P.; Mareš, M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: Mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (10), 1053–1063.
- ¹⁹ Renard, G.; Lara, F. A.; Cardoso de Cardoso, F.; Miguens, F. C.; Dansa-Peterski, M.; Termignoni, C.; Masuda, A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Ins. Mol. Biol.* **2002**, *11* (4), 325–328.
- ²⁰ Boldbaatar, D.; Sikasunge, Ch. S.; Battsetseg, B.; Xuan, X.; Fujisaki, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *36*, 25–36.
- ²¹ Yamaji, K.; Tsuji, N.; Miyoshi, T.; Islam, M. K.; Hatta, T.; Alim, M. A.; Anisuzzaman; Takenaka, A.; Fujisaki, K. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol. Int.* **2009**, *58*, 232–237.
- ²² Cruz, C. E.; Fogaca, A. C.; Nakayasu, E. S.; Angeli, C. B.; Belmonte, R.; Almeida, I. C.; Miranda, A.; Miranda, A. T. M.; Craik, Ch. S.; Schneider, E.; Caffrey, C. R.; et al. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit. Vectors* **2010**, *3* (63).
- ²³ Sonenshine, D. E.; Hynes, W. L.; Ceraul, S. M.; Mitchell, R. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor Variabilis* contribute to bacterial control. *Exp. Appl. Acarol.* **2005**, *36*, 207–223.
- ²⁴ Francischetti, I. M. B.; Sá-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **2010**, *14*, 2051–2088.
- ²⁵ Valenzuela, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology* **2004**, *129*, 83–94.
- ²⁶ Ries, U. J.; Wienen, W. Serine proteases as targets for antithrombotic therapy. *Drugs Fut* **2003**, *28*, 355.

- ²⁷ Monroe, D. M.; Hoffman, M.; Roberts, H. R. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1381–1389.
- ²⁸ Mann, K. G.; Butenas, S.; Brummel, K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 17–25.
- ²⁹ Aljamali, M.; Bowman, A. S.; Dillwith, J. W.; Tucker, J. S.; Yates, G. W.; Essenberg, R. C.; Sauer, J. R. Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick *Amblyomma americanum*, as assessed by radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 331–341.
- ³⁰ Ribeiro, J. M. C.; Evans, P. M.; Macswain, J. L.; Sauer, J. *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2alpha by RP-HPLC/bioassay and chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol.* **1992**, *74*, 112–116.
- ³¹ Zhu, K.; Sauer, J. R.; Bowman, A. S.; Dillwith, J. W. Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *J. Parasitol.* **1997**, *83*, 38–43.
- ³² Zhu, K.; Bowman, A. S.; Brigham, D.; Dillwith, J. W.; Essenberg, R. C.; Sauer, J. R. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum*. *Exp. Parasitol.* **1997**, *87*, 30–38.
- ³³ Dickinson, R. G.; O'Hagan, J. E.; Sholtz, M.; Binnington, K. C.; Hegarty, M. P. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1976**, *54*, 475–486.
- ³⁴ Horn, F.; Dos Santos, P. C.; Termignoni, C. *Boophilus microplus* Anticoagulant Protein: An Antithrombin Inhibitor Isolated from the Cattle Tick Saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 68–73.
- ³⁵ Gordon, J. R.; Allen, J. R. Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *J. Parasitol.* **1991**, *77*, 167–170.
- ³⁶ Wang, X.; Coons, L. B.; Taylor, D. B.; Stevens, S. E.; Gartner, T. K. Variabilin, a Novel RGD-containing Antagonist of Glycoprotein IIb-IIIa and Platelet Aggregation Inhibitor from the Hard Tick *Dermacentor variabilis*. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17785–17790.
- ³⁷ Iwanaga, S.; Okada, M.; Isawa, H.; Morita, A.; Chinzei, Y. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1926–1934.
- ³⁸ Joubert, A. M.; Crause, J. C.; Gaspar, A. R.; Clarke, F. C.; Spickett, M.; Neitz, A. W. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Exp. Appl. Acarol.* **1995**, *19*, 79–92.
- ³⁹ Ribeiro, J. M. C.; Makoul, G. T.; Robinson, D. R. *Ixodes scapularis*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *J. Parasitol.* **1988**, *74*, 1068–1069.
- ⁴⁰ Francischetti, I. M. B.; Valenzuela, J. G.; Andersen, J. F.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C. *Ixolaris*, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* **2002**, *99*, 3602–3612.
- ⁴¹ Narasimhan, S.; Koski, R. A.; Beaulieu, B.; Anderson, J. F.; Ramamoorthi, N.; Kantor, F.; Capello, M.; Fikrig, E. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* **2002**, *11*, 641–650.
- ⁴² Ribeiro, J. M. C.; Makoul, G.; Levine, J.; Robinson, D.; Spielman, A. Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of the tick *Ixodes sammini*. *J. Exp. Med.* **1985**, *161*, 332–344.
- ⁴³ Van De Locht, A.; Stubbs, M. T.; Bode, W.; Friedrich, T.; Bollschweiler, C.; Hoffken, W.; Huber, R. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6011–6017.
- ⁴⁴ Ribeiro, J. M. C.; Endris, T. M.; Endris, R. Saliva of the soft tick, *ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp. Biochem. Physiol., A: Physiol.* **1991**, *100*, 109–112.
- ⁴⁵ Nienaber, J.; Gaspar, A. R. M.; Neitz, A. W. H. Savignin, a Potent Thrombin Inhibitor Isolated from the Salivary Glands of the Tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Parasitol.* **1999**, *3*, 661–671.
- ⁴⁶ Joubert, A. M.; Louw, A. I.; Joubert, F.; Neitz, A. W. H. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Exp. Appl. Acarol.* **1998**, *22*, 603–619.
- ⁴⁷ Mans, B. J.; Coetzee, J.; Louw, A. I.; Gaspar, A. R. M.; Neitz, A. W. H. Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* **2000**, *24*, 271–282.
- ⁴⁸ Stutzer, Ch.; Mans, B. J.; Neitz, A. W. H.; Maritz-Olivier, Ch. *Ornithodoros savignyi*: Soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Exp. Parasitol.* **2009**, *122*, 318–327.
- ⁴⁹ Corral-Rodriguez, M. Á.; Macedo-Ribeiro, S.; Pereira, P. J. B.; Fuentes-Prior, P. Tickderived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 579–595.

- ⁵⁰ Champagne, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2005**, *34*, 221–227.
- ⁵¹ Paesen, G. C.; Adams, P. L.; Nuttal, P. A.; Stuart, D. L. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Acta Biochim. Biophys.* **2000**, *1482*, 92–101.
- ⁵² Sangamnatdej S.; Paesen G. C.; Slovak M.; Nuttall P. A. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol. Biol.* **2002**, *11*, 79–86.
- ⁵³ Paesen G. C.; Adams P. L.; Harlos K.; Nuttall P. A.; Stuart D. I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell.* 1999, *3*, 661–671.
- ⁵⁴ Mulenga, A.; Blandon, M.; Khumthong, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. *Exp. Appl. Acarol.* **2007**, *41*, 267–287.
- ⁵⁵ Oliveira, C. J. F.; Sá-Nunes, A.; Francischetti, I. M. B.; Carregaro, V.; Anatriello, E.; Silva, J. S.; Miranda Santos, I. K. F.; Ribeiro, J. M. C.; Ferreira, B. R. Deconstructing tick saliva. Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (13), 10960–10969.
- ⁵⁶ Lawrie, Ch. H. Ixodes Ticks: Serum Species Sensitivity of Anticomplement Activity. *Exp. Parasitol.* **1999**, *93*, 207–214.
- ⁵⁷ Lawrie, Ch. R. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in Ixodes ricinus ticks. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 31–38.
- ⁵⁸ Valenzuela, J. G.; Charlab, R.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C. Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, Ixodes scapularis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (25), 18717–18723.
- ⁵⁹ Ribeiro J. M.; Alarcon-Chaidez F.; Francischetti I. M.; Mans B. J.; Mather T. N.; Valenzuela J. G.; Wikel S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks. *Insect Biochem Mol Biol* **2006**, *36*, 111–129.
- ⁶⁰ Hajnická, V.; Kocáková, P.; Sláviková, M.; Slovák, M. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* **2001**, *23*, 483–489.
- ⁶¹ Wang, H. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 286–295.
- ⁶² Gillespie, R. D.; Dolan, M. C.; Piesman, J.; Titus, R. G. Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, Ixodes scapularis. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4319–4327.
- ⁶³ Packila, M.; Guilfoile, P. G. Mating, male Ixodes scapularis express several genes including those with sequence similarity to immunoglobulin-binding proteins and metalloproteases. *Exp. Appl. Acarol.* **2002**, *27*, 151–160.
- ⁶⁴ Francischetti, I. M. B.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)olytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector Ixodes scapularis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 869–875.
- ⁶⁵ Bastiani, M.; Hillebrand, S.; Horn, F.; Kist, T. B. L.; Guimaraes, J. A.; Termignoni, C. Cattle tick Boophilus microplus salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 1439–1446.
- ⁶⁶ Harnnoi, T.; Sakaguchi, T.; Nishikawa, Y.; Xuan, X.; Fujisaki, K. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, Haemaphysalis longicornis. *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *147*, 93–101.
- ⁶⁷ Decrem, Y.; Beaufays, J.; Blasioli, V.; Lahaye, K.; Brossard, M.; Vanhamme, L.; Godfroid, E. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick Ixodes ricinus. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1485–1499.
- ⁶⁸ Nuttal, P. A. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* **2004**, *129*, 177–189.
- ⁶⁹ Mansfield, K. L.; Johnson, N.; Phipps, L. P.; Stephenson, J. R.; Fooks, A. R.; Solomon, T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1781–1794.
- ⁷⁰ Labuda, M.; Nuttall, P. A. Tick-borne viruses. *Parasitology* **2004**, *129*, 221–245.
- ⁷¹ Dumpis, U.; Crook, D.; Oksi, J. Tick-Borne Encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*, 882–890.
- ⁷² http://www.sciencephoto.com/image/248087/530wm/M0500270-Coloured_TEM_of_tick-borne_encephalitis_virus-SPL.jpg (2.1.2012)
- ⁷³ Süss, J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond - the epidemiological situation as of 2007. *Euro. Surveill.* **2008**, *13*, 18916.
- ⁷⁴ Růžek, D.; Gritsun, T. S.; Forrester, N. L.; Gould, E. A.; Kopecký, J.; Golovchenko, M.; Rudenko, N.; Grubhoffer, L. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* **2008**, *374*, 249–255.

- ⁷⁵ Marques, A. R. Lyme disease: A review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2010**, *10*, 13–20.
- ⁷⁶ Skotarczak, B. Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann. Agric. Environ. Med* **2009**, *16*, 1–8.
- ⁷⁷ Piesman, J.; Mather, T. N.; Sinski, R. J.; Spielman, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 557–558.
- ⁷⁸ <http://www.sciencephoto.com/media/11757/enlarge> (2.1.2012)
- ⁷⁹ Blanco, J. R.; Oteo, J. A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2002**, *8* (12), 763–772.
- ⁸⁰ Homer, M. J.; Aguilar-Delfin, I.; Telford, S. R.; Krause, P. J.; Persing, D. H. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13* (3), 451–469.
- ⁸¹ Petri, E.; Gniel, D.; Zent, O. Tick-borne encephalitis (TBE) trends in epidemiology and current and future management. *Travel. Med. Inf. Dis.* **2010**, *8* (4), 233–245.
- ⁸² Vodrážka, Z. *Biochemie*, 2nd ed.; Academia: Praha, 1996.
- ⁸³ Barrett, A. J.; McDonald, K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* **1986**, *237*, 935.
- ⁸⁴ Puente, X. S.; Sanchez, L. M.; Overall, C. M.; Lopez-Otin, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544–558.
- ⁸⁵ Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 785–799.
- ⁸⁶ http://merops.sanger.ac.uk/substrate_menu.shtml (4.1.2012)
- ⁸⁷ Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. Cysteine Cathepsins: From Structure, Function and Regulation to New Frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824* (1), 68–88.
- ⁸⁸ Rossi, A.; Deveraux, Q.; Turk, B.; Sali, A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 363–372.
- ⁸⁹ Salminen-Mankonen, H. J.; Morko, J.; Vuorio, E. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 315–323.
- ⁹⁰ Goulet, B.; Baruch, A.; Moon, N. S.; Poirier, M.; Sansregret, L.L.; Erickson, A.; Bogyo, M.; Nepveu, A. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 207–219.
- ⁹¹ Duncan, E. M.; Muratore-Schroeder, T. L.; Cook, R. G.; Garcia, B. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Allis, S. D. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* **2008**, *135*, 284–294.
- ⁹² Varughese, K. I.; Ahmed, F. R.; Carey, P. R.; Hasnain, S.; Huber, C. P.; Storer, A. C. Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1330–1332.
- ⁹³ Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R. A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N.; Bode The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **1991**, *10* (9), 2321–2330.
- ⁹⁴ Turk, D.; Janjic, V.; Stern, I.; Podobnik, M.; Lamba, D.; Dahl, S.W.; Lauritzen, C.; Pedersen, J.; Turk, V.; Turk, B. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6570–6582.
- ⁹⁵ Baldwin, E. T.; Bhat, T.; Gulnik, S.; Hosur, M. V.; Sowder, R. C.; Cachau, R. E.; Collins, J.; Silva, A. M.; Erickson, J. W. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 6796–6800.
- ⁹⁶ Somoza, J. R.; Palmer, J. T.; Ho, J. D. The Crystal Structure of Human Cathepsin F and Its Implications for the Development of Novel Immunomodulators. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 559–568.
- ⁹⁷ Guncar, G.; Podobnik, M.; Pungercar, J.; Štrukelj, B.; Turk, V.; Turk, D. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure* **1998**, *15*, 51–61.
- ⁹⁹ Fujishima, A.; Imai, Y.; Nomura, T.; Fujisawa, Y.; Yamamoto, Y.; Sugawara, T. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. *FEBS Lett.* **1997**, *407* (1), 47–50.
- ¹⁰⁰ Mc Grath, M. E.; Palmer, J. T.; Bromme, D.; Somoza, J. R. Crystal structure of human cathepsin S. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1294–1302.
- ¹⁰¹ Somoza, J. R.; Zhan, H.; Bowman, K. K.; Yu, L.; Mortara, K. D.; Palmer, J. T.; Clark, J. M.; McGrath, M. E. Crystal Structure of Human Cathepsin V. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12543–12551.
- ¹⁰² Guncar, G.; Klemencic, I.; Turk, B.; Turk, V.; Karaoglanovic-Carmona, A.; Juliano, L.; Turk, D. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* **2000**, *8*, 305–313.

- ¹⁰³ Sajid, M.; McKerrow, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *120*, 1–21.
- ¹⁰⁴ Chapman, H. A.; Riese, R. J.; Shi, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, *59*, 63–68.
- ¹⁰⁵ Ménard, R.; Carriere, J.; Laflamme, P.; Plouffe, C.; Khouri, H. E.; Vernet, T.; Tessier, D. C.; Thomas, D. Y.; Storer, A. C. Contribution of the Glutamine 19 Side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8924–8928.
- ¹⁰⁶ Beveridge, A. J. A theoretical study of the active sites of papain and S195C rat trypsin: Implications for the low reactivity of mutant serine proteinases. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1355–1365.
- ¹⁰⁷ Choe, Y.; Leonetti, F.; Greenbaum, D.; Lecaille, F.; Bogyo, M.; Brömme, D.; Ellman, J. A.; Craik, Ch. S. Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (18), 12824–12832.
- ¹⁰⁸ Ishidoh, K.; Kominami, E. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol. Chem.* **2002**, *383* (12), 1827–1831.
- ¹⁰⁹ Braulke, T.; Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 605–614.
- ¹¹⁰ Wiederanders, B.; Kaulmann, G.; Schilling, K. Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2003**, *4*, 309–326.
- ¹¹¹ Coulombe, R.; Grochulski, P.; Sivaraman, J.; Ménard, R.; Mort, J. S.; Cygler, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* **1996**, *15* (20), 5492–5503.
- ¹¹² Vernet, T.; Berti, P.; Montigni, Ch.; Musil, R.; Tessier, D.; Ménard, R.; Magny, M. C.; Storer, A. C.; Thomas, D. Y. Processing of papain precursor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (18), 10838–10846.
- ¹¹³ Jeral, R.; Žerovnik, E.; Kidrič, J.; Turk, V. pH-induced Conformational Transitions of the Propeptide of Human Cathepsin L. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (19), 11498–11504.
- ¹¹⁴ Ménard, R.; Carmona, E.; Takebe, S.; Dufour, E.; Plouffe, C.; Mason, P.; Mort, J. S. Autocatalytic Processing of Recombinant Human Procathepsin L. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (8), 4478–4484.
- ¹¹⁵ Kreusch, S.; Fehn, M.; Maubach, G.; Nissler, K.; Rommerskirch, W.; Schilling, K.; Weber, E.; Wenz, I.; Wiederanders, B. An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 2965–2972.
- ¹¹⁶ Wiederanders, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50* (3), 697–713.
- ¹¹⁷ Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry*, 3rd ed.; Wiley: New Jersey, 2004.
- ¹¹⁸ Fairhead, M.; Kelly, S. M.; van der Walle, Ch. F. A heparin binding motif on the pro-domain of human procathepsin L mediates zymogen destabilization and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 862–867.
- ¹¹⁹ Ishidoh, K.; Kominami, E. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *217* (2), 624–631.
- ¹²⁰ Čaglič, D.; Pungerčar, J. R.; Pejler, G.; Turk, V.; Turk, B. Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J. Biol. Chem.* **2007**, *28*, 33076–33085.
- ¹²¹ Nascimento, F. D.; Rizzi, C. C. A.; Nantes, I. L.; Stefe, I.; Turk, B.; Carmona, A. K.; Nader, H. B.; Juliano, L.; Tersariol, I. L. S. Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436*, 323–332.
- ¹²² Vasiljeva, O.; Dolinar, M.; Pungerčar, J. R.; Turk, V.; Turk, B. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1285–1290.
- ¹²³ Li, Z.; Kienetz, M.; Cherney, M. M.; James, M. N. G.; Brömme, D. The Crystal and Molecular Structures of a Cathepsin K:Chondroitin Sulfate Complex. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 78–91.
- ¹²⁴ Cherney, M. M.; Lecaille, F.; Kienetz, M.; Nallaseth, F. S.; Li, Z.; James, M. N. G.; Brömme, D. Structure-Activity Analysis of Cathepsin K/Chondroitin 4-Sulfate Interactions. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (11), 8988–8998.
- ¹²⁵ Novinec, M.; Kovačič, L.; Lenarčič, B.; Baici, A. Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 379–389.
- ¹²⁶ Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42* (3), 523–528.

- ¹²⁷ Yamamoto, A.; Hara, T.; Tomoo, K.; Ishida, T.; Fujii, T.; Hata, Y.; Murata, M.; Kitamura, K. Binding Mode of CA074, a Specific Irreversible Inhibitor, to Bovine Cathepsin B as Determined by X-Ray Crystal Analysis of the Complex. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 974–977.
- ¹²⁸ Otto, H. H.; Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133–171.
- ¹²⁹ Katunuma, N.; Murata, E.; Kakegawa, H.; Matsui, A.; Tsuzuki, H.; Tsuge, H.; Turk, D.; Turk, V.; Fukushima, M.; Tada, Y.; Asao, T. Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 6–10.
- ¹³⁰ Powers, J. C.; Asgjan, J. A.; Ekici, Ö. D.; James, K. E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- ¹³¹ Turk, V.; Stoka, V.; Turk, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance.. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 5406–5420.
- ¹³² Hsing, L. C.; Rudensky, A. Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* **2005**, *207*, 229–241.
- ¹³³ Ohashi, K.; Naruto, M.; Nakaki, T.; Sano, E. Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1649*, 30–39.
- ¹³⁴ Goulet, B.; Baruch, A.; Moon, N. S.; Poirier, M.; Sansregret, L. L.; Erickson, A.; Bogyo, M.; Nepveu, A. A Cathepsin L Isoform that Is Devoid of a Signal Peptide Localizes to the Nucleus in S Phase and Processes the CDP/Cux Transcription Factor. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 207–219.
- ¹³⁵ Duncan, E. M.; Muratore-Schroeder, T. L.; Cook, R. G.; Garcia, B. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Allis, C. D. Cathepsin L Proteolytically Processes Histone H3 During Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell* **2008**, *135*, 284–294.
- ¹³⁶ Funkelstein, L.; Toneff, T.; Hwang, S. R.; Reinheckel, T.; Peters, Ch.; Hook, V.; Cathepsin L participates in the production of neuropeptide Y in secretory vesicles, demonstrated by protease gene knockout and expression. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 384–391.
- ¹³⁷ Yasothornsrikul, S.; Greenbaum, D.; Medzihradszky, K. F.; et al. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *PNAS* **2003**, *100* (16), 9590–9595.
- ¹³⁸ Conus, S.; Simon, H. U. Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1374–1382.
- ¹³⁹ Yang, Z.; Cox, J. L. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. *Cancer Cell Int.* **2007**, *7* (8),
- ¹⁴⁰ Mohamed, M. M.; Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Canc. Rev* **2006**, *6*, 764–775.
- ¹⁴¹ Franta, Z.; Sojka, D.; Frantova, H.; Dvorak, J.; Horn, M.; Srba, J.; Talacko, P.; Mares, M.; Schneider, E.; Craik, C. S.; McKerrow, J. H.; et al. IrCL1 – The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, Ixodes ricinus. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41* (12), 1253–1262.
- ¹⁴² Aplikace Compute pI/Mw: http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool (29.3.2012)
- ¹⁴³ Cregg, J. M.; Cereghino, J. L.; Shi, J.; Higgins, D. R. Recombinant Protein Expression in Pichia pastoris. *Mol. Biotechnol.* **2000**, *16*, 23–52.
- ¹⁴⁴ Sijwali, P. S.; Brinen, B. S.; Rosenthal, P. J. Systematic Optimization of Expression and Refolding of the Plasmodium falciparum Cysteine Protease Falcipain-2. *Protein Expression Purif.* **2001**, *22*, 128–134.
- ¹⁴⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, (20.7.2010)
- ¹⁴⁶ <http://www.stratagene.com/sdmdesigner/>, (20.7.2010)
- ¹⁴⁷ EasySelect Pichia Expression Kit, User Manual, 2010, Invitrogen
- ¹⁴⁸ Chowdhury, S. F.; Joseph, L.; Kumar, S.; Tulsidas, T. R.; Bhat, S.; Ziomek, E.; Menard, R.; Sivaraman, J.; Purisima, E. O. Exploring inhibitor binding at the S' subsites of cathepsin L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1361–1368.
- ¹⁴⁹ Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- ¹⁵⁰ Blakesley, R. W.; Boezi, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **1977**, *82* (8), 580–582.
- ¹⁵¹ Ruml, T.; Rumlová, M. *Genové inženýrství*; VŠCHT: Praha, 2002.
- ¹⁵² Crooks, G. E.; Hon, G.; Chandonia, J. M.; Brenner, S. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1188–1190.
- ¹⁵³ Srba, J. Rekombinantní cysteinové peptidasy klišťat. Diplomová práce, PřF UK, 2009.
- ¹⁵⁴ Bohley, P.; Kirschke, H.; Langner, J.; Ansorge, S.; Wiederanders, B.; Hanson, H. Intracellular protein breakdown. *Tissue Proteinases*; North-Holland: Amsterdam, **1971**; pp

187–219. cit. dle Kirschke, H.; Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. *Lysosomal cysteine proteinases*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 1998.

¹⁵⁵ Dehrmann, F. M.; Coetzer, T. H. T.; Pike, R. N.; Dennison, C. Mature Cathepsin L Is Substantially Active in the Ionic Milieu of the Extracellular Medium. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *324* (1), 93–98.

¹⁵⁶ Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8* (2), 93–99.

¹⁵⁷ Barret, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189–198.

¹⁵⁸ Stack, C.M.; Caffrey, C.R.; Donnelly, S.M.; Seshadri, A.; Lowther, J.; Tort, J.F.; Collins, P.R.; Robinson, M.W.; Xu, W.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S.; Geiger, S.R.; Marion, R.; Brinen, L.S.; Dalton, J.P. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9896–9908.

¹⁵⁹ Talacko, P. Cathepsin L z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Bakalářská práce, PřF UK, 2010.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------